

**Estudo do perfil farmacológico de novas
tiossemicarbazonas e novos complexos de
bismuto(III) e antimônio(III)**

Débora Costa Reis

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Débora Costa Reis

**Estudo do perfil farmacológico de novas
tiossemicarbazonas e novos complexos de bismuto(III)
e antimônio(III)**

Belo Horizonte

2011

UFMG-ICEx/DQ - 870^a
T. 317

Débora Costa Reis

**Estudo do perfil farmacológico de novas
tiossemicarbazonas e novos complexos de bismuto(III)
e antimônio(III)**

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

Belo Horizonte-MG-Brasil

2011

Reis, Débora Costa

Estudo do perfil farmacológico de novas tiossemicarbazonas e novos complexos de bismuto(III) e antimônio(III). / Débora Costa Reis. 2011.

150f. : il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo

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

Bibliografia

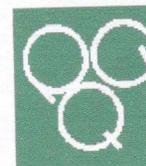
1.Química inorgânica - Teses 2.Complexos metálicos - Teses 3.Antimonio(III) - Teses 4.Bismuto(III) 5.Atividade farmacológica - Teses I.Beraldo, Heloisa de Oliveira, Orientadora. II. Título.

CDU 043

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Heloisa de Oliveira Beraldo.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Estudo do Perfil Farmacológico de Novas Tiossemicarbazonas e Novos Complexos de Bismuto(III) e Antimônio(III)"

Débora Costa Reis

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo
Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG

A. E. Mauro
Prof. Antonio Eduardo Mauro
UNESP

Silvio do Desterro Cunha
Prof. Silvio do Desterro Cunha
UFBA

Ynara Marina Idemori
Profa. Ynara Marina Idemori
UFMG

Geraldo Magela de Lima
Prof. Geraldo Magela de Lima
UFMG

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2011.

Agradecimentos

- ❖ À Profa. Heloisa pela orientação, apoio e dedicação durante a realização deste trabalho.
- ❖ Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.
- ❖ Aos pesquisadores Dra. Isolda Maria de Castro Mendes (UFMG), Dr. Nivaldo Speziali (UFMG), Dra. Solange M. Wardell (Fiocruz-RJ), Prof. Rodiney Augusti (UFMG), Dra. Elaine M. S. Fagundes (UFMG), Dra. Valéria R. A. Pereira (Fiocruz-Recife) e Profa. Jackeline Jacqueline Aparecida Takahashi (UFMG) pela colaboração na realização deste trabalho.
- ❖ Às secretárias da Pós-graduação, Paulete, Lilian e Kátia obrigada pelo carinho, atenção e boa vontade.
- ❖ Aos colegas do laboratório 290, especialmente ao Angel, Anayive, Gabrieli, Isolda, Jeferson, Josane, Karina e Rafael pela amizade, carinho e por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável.
- ❖ Aos alunos de iniciação científica que colaboraram com a execução do trabalho, em especial Fernanda, Lucas e Nayane.
- ❖ Aos colegas e professores do Departamento de Química pela amizade e boa convivência ao longo dos anos.
- ❖ À Dalva pela amizade e companheirismo ao longo de todo o doutorado.
- ❖ Às queridas Andréia, Daniela, Isabela, Janaína, Jéssica e Karine obrigada por me suportarem em oração e pela amizade preciosa de vocês.
- ❖ Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo.
- ❖ Aos meus pais e meu irmão, obrigada por sonhar esse sonho comigo.
- ❖ Ao meu Deus e Pai, que plantou esse sonho no meu coração e me sustentou até que se realizasse.

Resumo

Uma série de oito novas tiossemicarbazonas derivadas de imidazol foi sintetizada: 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT), *N*(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh), 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT), *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzTM), *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTPh), 4-(1*H*-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcT), *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTM) e *N*(5)-fenil-4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTPh). As estruturas cristalográficas de ImT, ImTPh, ImBzT, ImBzTM e ImBzTPh foram determinadas por difração de raios-X.

De forma geral, os compostos apresentaram baixa atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra os fungos *Aspegillus flavus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. ImT e 4ImBzT foram os únicos compostos que apresentaram atividade contra *C. cladosporioides* e foram mais ativas que os compostos de controle lapachol e nistatina.

Foram obtidos três complexos de bismuto(III) com 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH) e seus derivados *N*(4)metil- (H2Bz4M) e *N*(4)-fenil- (H2Bz4Ph) substituídos: [Bi(H2Bz4DH)O(OH)], [Bi(H2Bz4M)Cl₃] e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂]. [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] e [Bi(H2Bz4M)Cl₃] poderiam existir na forma dimérica contendo pontes μ -oxo e μ -cloroeto, respectivamente. Foram também obtidos os complexos de antimônio(III) [Sb(2Bz4DH)Cl₂] [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] e a estrutura cristalográfica de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] foi determinada por difração de raios-X.

Complexos de bismuto(III) foram sintetizados com 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados *N*(4)-metil- (H2Am4M) e *N*(4)-fenil- (H2Am4Ph) substituídos: [Bi(2Am4DH)Cl₂], [Bi₂(H2Am4M)(2Am4M)Cl₅] e [Bi(2Am4Ph)Cl₂].2H₂O. Novamente observou-se evidências da presença de uma espécie dimérica, [Bi₂(H2Am4M)(2Am4M)Cl₅]. Foram igualmente obtidos quatro complexos de antimônio(III) com 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas: [Sb(2Am4DH)Cl₂], [Sb(2Am4M)Cl₂], [Sb(H2Triazo4Ph)₂Cl₃], onde houve ciclização da tiossemicarbazona ao composto (4-fenil-5-piridino-2-il-2,4-diidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-iona), e [Sb₂(Am4Ph)₂Cl₃][SbCl₄].

Foram ainda preparados três complexos de bismuto(III) com *N*(4)-*orto*-, *N*(4)-*meta*- e *N*(4)-*para*-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona: [Bi(2Ac4oT)Cl₂], [Bi(2Ac4mT)Cl₂] e [Bi(2Ac4pT)Cl₂]. As estruturas cristalográficas de [Bi(2Ac4oT)Cl₂] e [Bi(2Ac4pT)Cl₂] revelaram que os complexos se apresentam na forma de polímeros. A estrutura do dímero

[Bi(2Ac4mT)Cl₂DMF]₂ foi também determinada. Complexos de antimônio(III) foram também obtidos com essa série de tiossemicarbazonas: [Sb(2Ac4oT)Cl₂], [Sb(2Ac4mT)Cl₂] e [Sb(2Ac4pT)Cl₂].

A atividade antimicrobiana das tiossemicarbazonas e seus complexos foi investigada frente a culturas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. De modo geral pode-se dizer que a coordenação das três famílias de tiossemicarbazonas ao bismuto(III) levou a um aumento de suas atividades antibacteriana e antifúngica. A coordenação ao antimônio(III) resultou em melhora de atividade antibacteriana em alguns casos mas não fez melhorar a atividade antifúngica.

A complexação das tiossemicarbazonas estudadas ao antimônio(III) levou a um aumento de sua ação anti-tripanosoma. No entanto a elevada citotoxicidade tanto dos ligantes quanto dos complexos diminui a possibilidade de que esses compostos se tornem candidatos a fármacos antichagásicos.

Todas as famílias de tiossemicarbazonas estudadas mostraram-se citotóxicas frente às linhagens de células leucêmicas. A coordenação ao bismuto(III) resultou em aumento de citotoxicidade contra células HL-60 no caso de 2-benzoilpiridina- e 2-piridinoformida tiossemicarbazonas. A coordenação dessas tiossemicarbazonas ao antimônio(III) resultou em aumento de atividade contra células HL-60 e Jurkat. No caso da *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, que são as mais ativas, a coordenação ao bismuto(III) e ao antimônio(III) resultou em melhora de atividade em complexos isolados.

Em geral as três famílias de tiossemicarbazonas exercem sua atividade citotóxica em células HL-60 por meio de mecanismos que envolvem apoptose celular e em células Jurkat por processos não apoptóticos. Em alguns casos a coordenação ao antimônio(III) resultou em ativação de processos apoptóticos em células Jurkat. Um dos complexos de antimônio(III), [Sb(2Ac4mT)Cl₂], mostrou-se efetivo na ativação de caspases.

Complexos de bismuto(III) foram obtidos com 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol, HQI): [Bi(QN)O]₂.0,25EtOH, [Bi(QC)O]₂.2H₂O e [Bi(QI)₂Cl₂].3HCl. A estrutura cristalográfica de [Bi(QI)₃] foi determinada. Os complexos de antimônio(III) [Sb(QN)₂Cl], [Sb(QC)₂Cl].EtOH e [Sb(QI)₂Cl] foram igualmente sintetizados.

Com relação aos derivados de quinolinas, os resultados sugerem que em muitos casos a coordenação ao bismuto(III) e ao antimônio(III) resultou em melhora da atividade antimicrobiana. A coordenação ao antimônio(III) resultou igualmente em melhora da atividade antitripanossoma, mas, novamente, a citotoxicidade dos compostos não permite considerá-los para estudos futuros.

A coordenação dos derivados de quinolina ao bismuto(III) não levou a melhora de sua ação citotóxica contra células leucêmicas e a coordenação ao antimônio(III) resultou em melhora da citotoxicidade em alguns complexos.

Sumário

Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 - Química Inorgânica Medicinal.....	1
1.2 - Tiossemicarbazonas e a Química Medicinal.....	3
1.3 - Quinolinas e Química Medicinal/Química Inorgânica Medicinal.....	6
1.4 - Antimônio: usos em medicina.....	7
1.5 - Bismuto: usos em medicina.....	9
1.6 - O presente trabalho:.....	11
Capítulo 2 - Parte Experimental.....	13
2.1 - Equipamentos e Procedimentos.....	13
2.2 - Obtenção de ligantes e complexos.....	14
2.2.1 - Obtenção de 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT) e N(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh).....	14
2.2.2 - Obtenção de 4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT), N(5)-metil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTM) e N(5)-fenil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTPh).....	15
2.2.3 - Obtenção de 4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcT), N(5)-metil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTM) e N(5)-fenil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTPh).....	15
2.2.4 - Obtenção de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH), N(4)-metil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4M) e N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph).....	15
2.2.5 - Obtenção de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH), N(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4M) e N(4)-fenil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4Ph).....	15
2.2.6 - Obtenção de N(4)- <i>orto</i> , N(4)- <i>meta</i> e N(4)- <i>para</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT).....	16
2.2.7 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH), N(4)-metil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4M) e N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph).....	16
2.2.8 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH), N(4)-metil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4M) e N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph).....	16
2.2.9 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH), N(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4M) e N(4)-fenil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4Ph).....	17

2.2.10 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH), N(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4M) e N(4)-fenil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona.....	17
2.2.11 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT).....	17
2.2.12 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT).....	18
2.2.13 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) de 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-Cl-8-hidroxiquinolina (HQC) e clioquinol (HQI).....	18
2.2.13 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) com 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-Cl-8-hidroxiquinolina (HQC) e clioquinol (HQI).....	18
2.3 - Espectrometria de massas por ionização por eletrospray (ESI-MS) e espectrometria de massas seqüencial (MS/MS).....	19
2.4 - Avaliação da atividade farmacológica.....	19
2.4.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição.....	19
2.4.2 - Avaliação de Atividade antifúngica pelo método de microdiluição.....	20
2.4.3 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	20
2.4.4 - Avaliação da atividade anti <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Capítulo 3 - Tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.....	25
3.1 - Tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.....	25
3.2 - Análise por difração de raios-X das estruturas cristalográficas das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol.....	35
3.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol.....	46
3.3 - Avaliação da atividade antifúngica das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol.....	47
3.4 - Atividade citotóxica contra linhagens de células de leucemia humana.....	49
Capítulo 4 - Complexos bismuto(III) e antimônio(III) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina.....	50
I. Complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.....	50
4.1 - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	57
4.2 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.....	58
4.2.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	58
4.2.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	60
II. Complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.....	63

4.3 - Análise por difração de raios-X da estrutura cristalográfica de [Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)...	67
4.4 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas	72
4.4.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	72
4.4.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	74
4.4.3 - Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma Cruzi</i>	77
Capítulo 5 - Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.....	79
I. Complexos de bismuto(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona.....	79
5.1 - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	84
5.2 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.....	86
5.2.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	86
5.2.2 - Avaliação da atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	87
II. Complexos de antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.....	89
5.3 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida.....	95
5.3.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	95
5.3.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	96
5.3.3- Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma Cruzi</i>	99
Capítulo 6 - Complexos bismuto(III) e antimônio(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.....	102
I. Complexos de bismuto(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas	102
6.1 - Determinação das estruturas cristalográficas de [Bi(2Ac4oT)Cl ₂] _n (1a), [Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂ (2a), [Bi(2Ac4pT)Cl ₂] _n (3a).....	106
6.2 - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	113
6.3 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona.....	115
6.3.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	115
6.3.2 - Avaliação da atividade citotóxica frente a células de leucemia humana.....	116
II. Complexos de antimônio(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.....	117
6.4 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona.....	120
6.4.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	120

6.4.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana	122
Capítulo 7 - Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 8-hidroxiquinolina, 5-cloro-8-hidroxiquinolina e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol).....	126
I. Complexos de bismuto(III) de derivados de 8-hidroxiquinolina.....	126
7.1 - Análise por difração de raios-X da estrutura cristalográfica de [Bi(QI) ₃] (3a).....	132
7.2 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de derivados de quinolinas.....	136
7.2.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	136
7.2.2 - Avaliação da atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	137
II. Complexos de antimônio(III) de derivados de 8-hidroxiquinolina.....	138
7.3 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de derivados de quinolinas	143
7.3.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	143
7.3.2 - Avaliação da atividade citotóxica contra células de leucemia humana.....	144
7.3.3 - Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma Cruzi</i>	145
Capítulo 8 - Discussão e Conclusões.....	147
Anexos.....	155

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação da estrutura genérica de tiosemicarbonas.....	3
Figura 1.2 - Representação das estruturas de: (a) 4-acetamidobenzaldeído tiosemicarbona (tioacetazona); (b) 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiosemicarbona (triapina-3-AP).....	4
Figura 1.3 - Representação da estrutura da quinolina.....	5
Figura 1.4 - Representação das estruturas de: (a) 8-hidroxiquinolina e (b) 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol).....	6
Figura 3.1 - Representação da estrutura genérica das tiosemicarbonas derivadas de imidazóis.....	25
Figura 3.2 - Esquema de síntese das tiosemicarbonas derivadas de imidazóis.....	25
Figura 3.3 - (A) Isômeros configuracionais <i>Z</i> e <i>E</i> e (B) formas tautoméricas tiona-tiol para as tiosemicarbonas ImT R = H (1) e ImTPh R = Ph (2).....	27
Figura 3.4 - Espectro de ¹³ C RMN (DMSO-d ₆) do composto (2) na região entre δ 180,00 - δ 115,00 ppm.....	28
Figura 3.5 - Simulação do espectro de ¹³ C RMN dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> para forma tiol do (2).....	28
Figura 3.6 - Esquema de numeração das estruturas para atribuição dos sinais de RMN de ImT (1) e ImTPh (2).....	29
Figura 3.7 - Esquema de numeração das estruturas para atribuição dos sinais de RMN de 4ImBzT (3), 4ImBzTm (4) e 4ImBzTPh (5).....	30
Figura 3.8 - Esquema de numeração das estruturas para atribuição dos sinais de RMN de 4ImAcT (6), 4ImAcTm (7) e 4ImAcTPh (8).....	32
Figura 3.9 - Espectro de ¹ H RMN (DMSO-d ₆) do composto (1) na região entre δ 14,00 - δ 6,5 ppm.....	34
Figura 3.10 - Diagrama ORTEP de 4(5)-imidazol carboxaldeído tiosemicarbona com uma molécula de água na unidade assimétrica, ImT.H ₂ O (1).....	38
Figura 3.11 - Diagrama ORTEP de <i>N</i> (5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiosemicarbona, ImTPh (2).....	38
Figura 3.12 - Diagrama ORTEP de 4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído tiosemicarbona 4ImBzT (3).....	39
Figura 3.13 - Diagrama ORTEP de <i>N</i> (5)-metil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzTM (4).....	39
Figura 3.14 - Diagrama ORTEP de <i>N</i> (5)-metil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzTPh (5).....	39

Figura 3.13 - Ligações de hidrogênio para 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona, ImT (1).....	42
Figura 3.15 - Ligações de hidrogênio para <i>N</i> (5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona, ImTPh (2).....	43
Figura 3.16 - Ligações de hidrogênio para 4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona, 4ImBzT (3).....	44
Figura 3.17 - Ligações de hidrogênio para <i>N</i> (5)-metil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído 4ImBzTM (4).....	44
Figura 3.18 - Ligações de hidrogênio para <i>N</i> (5)-metil-4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzTPh (5).....	45
Figura 4.1 - Representação estrutural de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH) e seus derivados <i>N</i> (4)metil- (H2Bz4M) e <i>N</i> (4)-fenil- (H2Bz4Ph) substituídos	50
Figura 4.2 - Representação dos isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> de H2Bz4Ph.....	53
Figura 4.2 - Representação dos isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> de H2Bz4Ph.....	54
Figura 4.4 - Espectro de ¹ H RMN em DMSO- <i>d</i> ₆ de a) H2Bz4Ph e b) [Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	55
Figura 4.5 – Espectro de massas de [Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2) no modo positivo.....	58
Figura 4.6 - Efeito citotóxico das 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos (2) e (3) (10 μM) em células de leucemia humana HL-60, e em células HL-60 com expressão ectópica de BcrAbl, Bcl-2 e Bcl-X _L	61
Figura 4.7 - Curva termogravimétrica para o complexo [Sb(H2Bz4M)Cl ₃].2H ₂ O (5).....	64
Figura 4.8 - Espectro de ¹ H RMN em DMSO- <i>d</i> ₆ do complexo [Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6).....	66
Figura 4.9 - Diagrama ORTEP e numeração para [Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6).....	71
Figura 4.10 - Visão do empacotamento na estrutura cristalográfica de (6) apresentando as ligações de hidrogênio N(4)-H(4)...Cl(1) ⁱ como linhas tracejadas.[operação de simetria: <i>i</i> : 1+x,y,z].....	72
Figura 4.11 - Efeito citotóxico das tiossemicarbazonas e seus complexos (4-6) 10 μM em células de leucemia humana Jurkat e HL-60, e em células HL-60 com expressão ectópica de BcrAbl, Bcl-2 ou Bcl-X _L	74
Figura 5.1 - Representação da estrutura de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados <i>N</i> (4)metil- (H2Am4M) e <i>N</i> (4)-fenil- (H2Am4Ph) substituídos.	79
Figura 5.2 - Curva termogravimétrica para o composto [Bi(2Am4Ph)Cl ₂].2H ₂ O (3).....	80
Figura 5.3 - Representação do dímero [Bi ₂ (H2Am4M)(2Am4M)Cl ₅] (2).....	82
Figura 5.4 - Espectro de ¹ H RMN em DMSO- <i>d</i> ₆ de a) H2Am4M e b) [Bi ₂ (H2Am4M)(2Am4M)Cl ₅] (2).....	83

Figura 5.5 - Espectro de massas para $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(2\text{Am4M})\text{Cl}_5]$ (2) no modo positivo.	85
Figura 5.6 - Espectro de massas seqüencial (MS/MS) do íon $m/z = 625,05$ correspondente ao pico majoritário do espectro de (2), demonstrando a formação da espécie $[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$ a partir de $[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$.	86
Figura 5.7 - Efeito citotóxico das 2-piridinoformamida tiosemicarbazonas e seus complexos (1-3) (10 μM) em células de leucemia humana Jurkat, HL-60, e em células HL-60 com expressão ectópica de BcrAbl, Bcl-2 ou Bcl-X _L .	88
Figura 5.8 - Representação da estrutura proposta para o complexo $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$.	90
Figura 5.9 - Espectro de ¹ H RMN em DMSO-d ₆ de a) H2Am4Ph e b) $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ (7).	93
Figura 5.10 - Mecanismo de ciclização de <i>N</i> -(4)-2piridinoformamida tiossemicarbazona	94
Figura 5.11 - Espectro de ¹ H RMN em DMSO-d ₆ de a) ligante ciclizado H2Triazo4Ph e b) $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$.	95
Figura 5.12 - Efeito citotóxico das tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e seus complexos de antimônio(III) (10 μM) em linhagens de célula Jurkat, HL-60, HL-60.Bcl-2 HL-60.Bcl-X _L e HL-60.Bcr.Abl.	98
Figura 6.1 - Representação da estrutura genérica de <i>N</i> (4)- <i>orto</i> (H2Ac4oT), <i>N</i> (4)- <i>meta</i> (H2Ac4mT) e <i>N</i> (4)- <i>para</i> -toluil (H2Ac4pT) 2-acetilpiridina tiossemicarbazona.	102
Figura 6.2 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) de (a) H2Ac4mT e (b) $[\text{Bi}(2\text{Ac4mT})\text{Cl}_2]$ (2).	105
Figura 6.3 - Diagrama ORTEP para $[\text{Bi}(2\text{Ac4mT})\text{Cl}_2]\text{DMF}]_2$ (2a).	109
Figura 6.4 - Diagrama ORTEP para $[\text{Bi}(2\text{Ac4oT})\text{Cl}_2]_n$ (1a).	110
Figura 6.5 - Diagrama ORTEP para $[\text{Bi}(2\text{Ac4pT})\text{Cl}_2]_n$ (3a).	110
Figura 6.6 - Empacotamento cristalino de $[\text{Bi}(2\text{Ac4mT})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (2a).	111
Figura 6.7 - Empacotamento cristalino para $[\text{Bi}(2\text{Ac4pT})\text{Cl}_2]_n$ (3a).	111
Figura 6.9 - Espectro de massas para $[\text{Bi}(2\text{Ac4oT})\text{Cl}_2]$ (1) no modo positivo.	114
Figura 6.10 - Espectro de massas seqüencial (MS/MS) do íon $m/z = 775,17$ correspondente ao pico majoritário do espectro de (1), demonstrando a formação da espécie $[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$ a partir de $[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$.	114
Figura 6.11 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) de (a) H2Ac4pT e (b) $[\text{Sb}(2\text{Ac4pT})\text{Cl}_2]$ (6).	119
Figura 6.12 - Indução da fragmentação de ADN em células HL-60 causada $[\text{Sb}(2\text{Ac4mT})\text{Cl}_2]$ (5) após tratamento com Z-VAD-FMK.	124

Figura 6.13 - Indução da ativação de caspase-3 em células HL60 causada por [Sb(2Ac4mT)Cl ₂] 10 μM por 12 horas. Os dados representam três experimentos independentes feitos em triplicata.....	125
Figura 7.1 - Representações estruturais de 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol, HQI).....	126
Figura 7.2 - Curva termogravimétrica para o complexo [Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1).....	127
Figura 7.3 - Curva termogravimétrica para o complexo [Bi(QC)O] ₂ .2H ₂ O (2).....	128
Figura 7.4 - Estrutura proposta do complexo [Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1).....	129
Figura 7.5 - Espectro de ¹ H RMN em DMSO-d ₆ de a) HQN e b) [Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1).....	130
Figura 7.6 - Representação ORTEP da unidade assimétrica de [Bi(QI) ₃] (3a).	133
Figura 7.7 - Distância Bi···Bi em [Bi(QI) ₃] (3a).....	134
Figura 7.8 - Curva termogravimétrica para o complexo [Sb(QC) ₂ Cl].EtOH (5).....	139
Figura 7.9 - Espectro de ¹ H RMN (DMSO-d ₆) de a) HQC e b) [Sb(QN) ₂ Cl].EtOH (5).....	141

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Temperaturas de fusão, massas molares, fórmulas moleculares, rendimentos de reações e análise elementar (valores teóricos em parêntesis) para tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.....	27
Tabela 3.2 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de <i>1H</i> -imidazol-5-carbaldeído (DMSO- d_6).....	30
Tabela 3.3 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das tiossemicabazonas derivadas de <i>1H</i> -imidazol-5-carbaldeído (DMSO- d_6).....	31
Tabela 3.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de 4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (DMSO- d_6).....	32
Tabela 3.5 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das tiossemicabazonas derivadas de 4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (DMSO- d_6).....	32
Tabela 3.6 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de 1-[4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)fenil]etanona (DMSO- d_6).....	33
Tabela 3.7 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das tiossemicabazonas derivadas de 1-[4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)fenil]etanona (DMSO- d_6)	34
Tabela 3.8 - Atribuição das principais bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.....	35
Tabela 3.9 - Resumo da coleção de dados e refinamento de ImT.H ₂ O (1), ImTPh (2), 4ImBzT (3), 4ImBzTM (4) e 4ImBzTPh (5).....	36
Tabela 3.10 - Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$) selecionados de 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT) (1) e <i>N</i> (5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh) (2).....	41
Tabela 3.11 - Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$) selecionados de 4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT) (3), <i>N</i> (5)-metil-4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTM) (4) e <i>N</i> (5)-metil-4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTPh) (5).....	41
Tabela 3.12 - Ligações de hidrogênio (Å, $^\circ$) para 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT) (1) e <i>N</i> (5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh) (2).....	42
Tabela 3.13 - Ligações de hidrogênio (Å, $^\circ$) para 4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT) (3), <i>N</i> (5)-metil-4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTM) (4), <i>N</i> (5)-metil-4-(<i>1H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTPh) (5).....	43

Tabela 3.14 - Ângulos entre planos de tiossemicarbazonas derivadas de 1 <i>H</i> -imidazol-5-carbaldeído.....	45
Tabela 3.15 - Ângulos entre planos de tiossemicarbazonas derivadas de 4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)benzaldeído.....	46
Tabela 3.16 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para as tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis (1)-(8).....	47
Tabela 3.17 - Valores de CIM ₅₀ das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol contra fungos fitopatogênicos e patógenos humanos.....	48
Tabela 3.18 - Efeito das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol no crescimento de linhagens de células leucêmicas HL60 e Jurkat (Dados em % proliferação celular a 10 (µM).....	49
Tabela 4.1 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.....	51
Tabela 4.2 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	52
Tabela 4.3 - Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n ^o) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H de [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] ₂ (1), [Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	54
Tabela 4.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³ C de [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	56
Tabela 4.5 - Dados de ESI-MS para os complexos [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3).....	57
Tabela 4.6 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para as 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Bi(III).....	59
Tabela 4.7 - Efeito citotóxico 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4Ph e de seus complexos de bismuto(III) (1-3) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.....	62
Tabela 4.8 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.....	63

Tabela 4.9 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos $[\text{Sb}(\text{2Bz4DH})\text{Cl}_2]$ (4), $[\text{Sb}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6).....	65
Tabela 4.10 - Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n^{e}) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H de $[\text{Sb}(\text{2Bz4DH})\text{Cl}_2]$ (4), $[\text{Sb}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6), (L = ligante) (DMSO- d_6).....	66
Tabela 4.11 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C de $[\text{Sb}(\text{2Bz4DH})\text{Cl}_2]$ (4), $[\text{Sb}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6), (L = ligante) (DMSO- d_6).....	67
Tabela 4.12 - Dados cristalográficos e refinamento da estrutura de $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6)....	68
Tabela 4.13 - Principais distâncias (Å), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas nas estruturas de $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6) e do ligante H2Bz4Ph.....	70
Tabela 4.14 - Principais ângulos ($^{\circ}$), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observado nas estruturas de $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6) e do ligante H2Bz4Ph.....	70
Tabela 4.15 - Ligações de hidrogênio (Å), observadas na estrutura de $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6).....	71
Tabela 4.16 -. Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III).....	72
Tabela 4.17 - Efeito citotóxico de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4Ph e de seus complexos de antimônio(III) (4-6) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.....	73
Tabela 4.18 - Porcentagem de fragmentação de ADN em linhagens de células de leucemia induzidas por 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M, H2Bz4Ph e seus complexos de antimônio(III).....	76
Table 4.19 - Valores de citotoxicidade e de IC_{50} de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4Ph e seus complexos de antimônio(III) contra formas tripomastigota e epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Tabela 5.1 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), fórmula molecular, massa molar e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.....	80
Tabela 5.2 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de $[\text{Bi}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$ (1), $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3).....	81

Tabela 5.3 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H de [Bi(2AmDH)Cl ₂] (1), [Bi ₂ (H ₂ Am ₄ M)(2Am ₄ M)Cl ₅] (2) e [Bi(2Am ₄ Ph)Cl ₂] (3), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	84
Tabela 5.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³ C de [Bi(2AmDH)Cl ₂] (1), [Bi ₂ (H ₂ Am ₄ M)(2Am ₄ M)Cl ₅] (2) e [Bi(2Am ₄ Ph)Cl ₂].2H ₂ O (3), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	84
Tabela 5.5 - Dados de ESI-MS para os complexos [Bi(2AmDH)Cl ₂] (1), [Bi ₂ (H ₂ Am ₄ M)(2Am ₄ M)Cl ₅] (2) e [Bi(2Am ₄ Ph)Cl ₂].2H ₂ O (3).....	85
Tabela 5.6 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) (1-3).....	87
Tabela 5.7 - Efeito citotóxico das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de bismuto(III) (1-3) em linhagens de célula tumoral HL-60 e Jurkat.....	89
Tabela 5.8 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.....	90
Tabela 5.9 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de [Sb(2AmDH)Cl ₂] (4), [Sb(2Am ₄ M)Cl ₂] (5), [Sb(H ₂ Triazo ₄ Ph) ₂ Cl ₃] (6) e [Sb ₂ (Am ₄ Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7).....	91
Tabela 5.10 - Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n ^o) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H de [Sb(2AmDH)Cl ₂] (4), [Sb(2Am ₄ M)Cl ₃] (5), [Sb(H ₂ Triazo ₄ Ph) ₂ Cl ₃] (6) e [Sb ₂ (Am ₄ Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄](7) (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	96
Tabela 5.11 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³ C de [Sb(2AmDH)Cl ₂] (4), [Sb(2Am ₄ M)Cl ₂] (5), [Sb(H ₂ Triazo ₄ Ph) ₂ Cl ₃] (6) e [Sb ₂ (Am ₄ Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	96
Tabela 5.12 - Concentração inibitória mínima contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e seus complexos de antimônio(III) (4-7).....	97
Tabela 5.13 - Efeito citotóxico das tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida H ₂ Am ₄ DH, H ₂ Am ₄ M e H ₂ Am ₄ Ph e de seus complexos de antimônio(III) (4-7) em linhagens de célula tumoral HL-60 e Jurkat.	99
Tabela 5.14 - Porcentagem de fragmentação de ADN em linhagens de células de leucemia induzida por 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas H ₂ Am ₄ DH, H ₂ Am ₄ M, H ₂ Am ₄ Ph e seus complexos de antimônio(III) (4-7).....	100

Tabela 5.15 - Valores de citotoxicidade e IC ₅₀ de H2Am4DH, H2Am4M e H2Am4Ph, seus complexos de antimônio(III) contra formas tripomastigota e epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
Tabela 6.1 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar, fórmula molecular e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.....	103
Tabela 6.2 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> -toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos [Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1), [Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2) e [Bi(2Ac4pT)Cl ₂].0,5 EtOH (3).....	104
Tabela 6.3 - Atribuições, multiplicidade (M), constante de acoplamento (J) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H de [Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1), [Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2) e [Bi(2Ac4pT)Cl ₂]].0,5 EtOH (3), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	106
Tabela 6.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³ C de [Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1), [Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2) e [Bi(2Ac4pT)Cl ₂]].0,5 EtOH (3), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	106
Tabela 6.5 - Resumo da coleção de dados cristalográficos e refinamento da estrutura de [Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂ (2a)	107
Tabela 6.6 - Principais distâncias (Å), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas nas estruturas de [Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂ (2a) e H2Ac4mT.....	112
Tabela 6.7 - Ângulos (°) selecionados para [Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂ (2a) e H2Ac4mT.....	112
Tabela 6.8 - Parâmetros das ligações de hidrogênio (Å e °) em [Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂ (2a).....	113
Tabela 6.9 - Dados de ESI-MS para os complexos [Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1), [Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2), [Bi(2Ac4pT)Cl ₂] (3).....	113
Tabela 6.10 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos de bismuto(III).....	115
Tabela 6.11 - Efeito citotóxico de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) (1-3) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.....	116
Tabela 6.12 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.....	117
Tabela 6.13 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos [Sb(2Ac4oT)Cl ₂] (4), [Sb(2Ac4mT)Cl ₂] (5) e [Sb(2Ac4pT)Cl ₂] (6).....	118

Tabela 6.14 - Atribuições, multiplicidade (M), constante de acoplamento (<i>J</i>) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H de [Sb(2Ac4oT)Cl ₂] (4), [Sb(2Ac4mT)Cl ₂] (5) e [Sb(2Ac4pT)Cl ₂] (6).....	120
Tabela 6.15 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³ C de [Sb(2Ac4oT)Cl ₂] (4), [Sb(2Ac4mT)Cl ₂] (5) e [Sb(2Ac4pT)Cl ₂] (6), (L = ligante) (DMSO-d ₆).....	120
Tabela 6.16 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para <i>N</i> (4)-orto, <i>N</i> (4)-meta e <i>N</i> (4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos de antimônio(III).....	121
Tabela 6.17 - Efeito citotóxico de <i>N</i> (4)-orto, <i>N</i> (4)-meta e <i>N</i> (4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos (4-6) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.....	122
Tabela 6.18 - Porcentagem de fragmentação de ADN em linhagens de células de leucemia induzidas por <i>N</i> (4)-orto, <i>N</i> (4)-meta e <i>N</i> (4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) (4-6).....	123
Tabela 7.1 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), fórmula molecular massa molar e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI).....	127
Tabela 7.2 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) de HQN, HQC, HQI e seus complexos [Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1), [Bi(QC)O] ₂ .2H ₂ O (2) e [Bi(QI) ₂ Cl].3HCl (3).....	129
Tabela 7.3 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ¹ H RMN, ¹³ C de 8-hidroxiquinolina (HQN) e [Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1) (DMSO-d ₆).....	131
Tabela 7.4 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ¹ H RMN, ¹³ C de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e [Bi(QC)O] ₂ .H ₂ O (2) (DMSO-d ₆).....	131
Tabela 7.5 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ¹ H RMN, ¹³ C de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI) e [Bi(QI) ₂ Cl].3HCl (3) (DMSO-d ₆).....	131
Tabela 7.6 - Dados cristalográficos e refinamento da estrutura de [Bi(QI) ₃] (3a).....	132
Tabela 7.7 - Principais distâncias (Å), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas na estrutura de [Bi(QI) ₃] (3a)	135
Tabela 7.8 - Principais ângulos de ligação (°), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas na estrutura de [Bi(QI) ₃] (3a).....	135
Tabela 7.9 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para HQN, HQC, HQI e seus complexos de bismuto(III) (1-3).....	136

Tabela 7.10 - Efeito citotóxico (porcentagem de proliferação celular) dos derivados de quinolina HQN, HQC, HQI e de seus complexos de bismuto(III) (1-3) em células HL-60 e Jurkat.....	137
Tabela 7.11 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio (III) de 8-hidroxiquinolina(HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina(HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI).....	138
Tabela 7.12 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) e seus complexos $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4), $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6).....	140
Tabela 7.13 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ^1H RMN e ^{13}C de 8-hidroxiquinolina (HQN) e $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4) (DMSO-d_6).....	142
Tabela 7.14 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ^1H RMN, ^{13}C de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (5) (DMSO-d_6).....	142
Tabela 7.15 - Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ^1H RMN, ^{13}C de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI) e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6) (DMF-d_7).....	142
Tabela 7.16 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> para HQN, HQC, HQI e seus complexos $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4), $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6).....	143
Tabela 7.17 - Atividade citotóxica (IC_{50}) dos derivados de 8-hidroxiquinolina e seus complexos $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4), $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6) contra linhagens de célula HL-60 e Jurkat.....	144
Tabela 7.18 - Valores de citotoxicidade e IC_{50} de HQN, HQC, HQI e seus complexos $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4), $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (5) e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6) contra formas tripomastigota e epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	145

Siglas e abreviaturas

ADB	Agar de batata
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHI	Infusão de cérebro e coração
COSY	Correlation Spectroscopy
CsI	Iodeto de céσιο
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMF	4,4-dimetil formamida
DMF-d ₇	4,4-dimetil formamida deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Espectrometria de massas
EM-ESI	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
FCS	Soro fetal bovino
HL-60	Células de leucemia promielocítica aguda
HL-60.Bcl2	Células de leucemia promielocítica aguda expressando proteínas antiapoptóticas Bcl2
HL-60.Bcl-X _L	Células de leucemia promielocítica aguda ectopicamente expressando proteínas antiapoptóticas Bcl-X _L
HL-60.Bcr.Abl	Células de leucemia promielocítica aguda ectopicamente expressando a tirosina quinase Bcr.abl
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Quantum Coherence
Hz	Hertz
IP	Iodeto de Propídeo
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Jurkat	Leucemia/linfoma de células T do adulto
KBr	Brometo de potássio
LABB	Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaBB)
M	Multiplicidade
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazol
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TG	Análise termogravimétrica
TMS	Tetrametilsilano
TMS	Tetrametilsilano
Z-DEVD-AMC	Benziloxicarbonil-7-amino-4-metilcumarina
Z-VAD-FMK	Benzil-oxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona

Capítulo 1-Introdução

1.1- Química Inorgânica Medicinal

Alguns metais têm um papel essencial nos sistemas vivos, pois interagem com moléculas biológicas importantes, como proteínas e o ADN, e também apresentam afinidade por moléculas como O₂, e o óxido nítrico, NO. Dessa forma, durante o processo de evolução natural, vários metais foram incorporados às funções essenciais da vida^{1,2}.

Um elemento é dito essencial quando sua falta no organismo causa algum tipo de disfunção ou debilita seriamente alguma função orgânica, e se de alguma forma a incorporação desse elemento restabelece o bom funcionamento do organismo em questão. Dentre os metais essenciais para o organismo humano, sete são necessários em quantidades substanciais (Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu e Zn). Outros, no entanto, são necessários em quantidades muito pequenas, os chamados elementos “traço”, entre os quais encontram-se Cr, Mn, Co, Mo¹. Mesmo os elementos que são necessários em quantidades traço desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, como por exemplo, o cobalto, que tem uma única ocorrência bioquímica conhecida, na coenzima B₁₂².

Os metais têm a habilidade de perder elétrons formando espécies catiônicas, o que os tornam solúveis nos sistemas biológicos. É na forma de cátions que os metais desempenham seu papel nos processos biológicos; sendo assim é comum a coordenação e interação destes com espécies ricas em elétrons, tais como proteínas e DNA.²

As moléculas que contêm íons metálicos em geral participam de processos importantes para o funcionamento do organismo. O ferro, presente na hemoglobina e na mioglobina, é fundamental no transporte e armazenamento de O₂, além de participar do processo de transporte de elétrons no citocromo. O cálcio, além de ter papel estrutural fundamental em vários organismos, serve como mensageiro para a ação de hormônios participando dos processos de contração muscular e de coagulação do sangue e ainda é fundamental na estabilização estrutural de algumas proteínas^{3,4}. Da mesma forma, o zinco está presente na insulina, hormônio que regula o metabolismo de açúcar no organismo, além de desempenhar papel estrutural nas proteínas do tipo “zinc finger”².

Além de desempenharem papel fundamental nas funções biológicas, existem relatos de uso de metais na medicina há mais de 5000 anos. Os egípcios usavam o cobre para purificar a água. Os chineses e árabes acreditavam que o ouro, por ser um metal nobre, podia

¹ J. A. Cowan, *Inorganic biochemistry: an introduction*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1997.

² C. Orvig, M. J. Abrams, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2201-2204.

³ I. Bertini, *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*. Sausalito, CA: University Science, 2007.

⁴ D. F. Shriver, P. W. Atkins, *Química inorgânica*, 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2003.

trazer benefícios à saúde. Paracelsus, já no século 16, utilizava sais de mercúrio como medicamento⁵.

Entretanto, o estudo racional do uso de complexos metálicos na medicina só ganhou impulso com o trabalho de Paul Ehrlich (1854-1915), que introduziu os primeiros conceitos de estrutura atividade, no estudo de complexos de arsênio para o tratamento da sífilis. Alfred Werner (1866-1919), que desenvolveu a teoria da ligação química nos complexos metálicos, em muito contribuiu para o desenvolvimento da Química Inorgânica Medicinal⁵.

Em 1965 Barnett Rosenberg e colaboradores descobriram as propriedades antitumorais de *cis*(diaminodicloroplatina(II)), (*cis*[Pt(NH₃)₂Cl₂]), a “cisplatina”. Esta foi, sem dúvida, uma das mais importantes descobertas no campo da Química Inorgânica Medicinal. A partir daí, cresceu o interesse pela busca de outros complexos metálicos com atividades farmacológicas. Atualmente há vários complexos metálicos em uso clínico além da cisplatina e do composto de segunda geração carboplatina, tais como complexos de antimônio(V) usados no tratamento de leishmaniases, (1-tio-β-glucanopiranosose 2,3,4,6-tetraacetato-S)ouro trifenilfosfina “auranofina”, usada no tratamento de artrite reumatóide, o “nitroprussiato” [Fe(CN)₅(NO)], empregado nas emergências hipertensivas. Outros sais de metais estão igualmente em uso clínico, como os sais de lítio, usados no tratamento de distúrbios psíquicos, e sais de bismuto, empregados no tratamento de doenças gastrointestinais⁵.

O estudo de metais também desenvolve um papel importante na radioterapia. Por exemplo, ¹¹¹In e ⁶⁷Ga são radionuclídeos utilizados na composição de fármacos para diagnóstico de imagem⁶. Finalmente, a coordenação de ligantes orgânicos a metais é usada como estratégia no tratamento de intoxicação por metal, seja esta causada por agentes externos, como intoxicação por chumbo, ou devida a alguma anomalia metabólica como, por exemplo, o excesso de cobre no organismo (doença de Wilson)¹.

A atividade antitumoral de complexos análogos à cisplatina e de complexos com outros metais como paládio, cobre, rutênio e ródio tem sido estudada^{7,8}. Outras atividades farmacológicas têm sido atribuídas a complexos metálicos tais como atividades antimicrobiana, antiparasitária e antiviral^{2,3,5}.

No presente trabalho foram estudados complexos de bismuto e antimônio com duas classes distintas de ligantes: tiossemicarbazonas e derivados de quinolina. Os compostos foram avaliados quanto ao seu perfil farmacológico através de investigação de suas propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e citotóxicas contra células tumorais humanas.

⁵ H. Beraldo, Cadernos temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 4-6.

⁶ T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, Chem. Rev. 110 (2010) 2858–2902.

⁷ V. Brabec, O. Nováková, Drug Resist. Updat. 9 (2006) 111–122.

⁸ K. S.O. Ferraz, L. Ferandes, D. Carrilho, M. C.X. Pinto, M. F. Leite, E. M. Souza-Fagundes, N. L. Speziali, I. C. Mendes, H. Beraldo, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7138-7144.

1.2-Tiossemicarbazonas e a Química Medicinal

As tiossemicarbazonas são uma importante classe de compostos em razão de suas propriedades farmacológicas, e por suas aplicações como agentes antivirais, antitumorais, antibacterianos, antiprotozoários, citotóxicos, dentre outros^{9,10,11}.

A Figura 1.1 mostra o esqueleto básico de uma tiossemicarbazona. Estes compostos são bases de Schiff, obtidos geralmente pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua obtenção, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final¹². Neste contexto a síntese de tiossemicarbazonas em escala industrial apresenta vantagens em relação a moléculas cuja síntese é feita em várias etapas e/ou dão origem a vários produtos de reação.

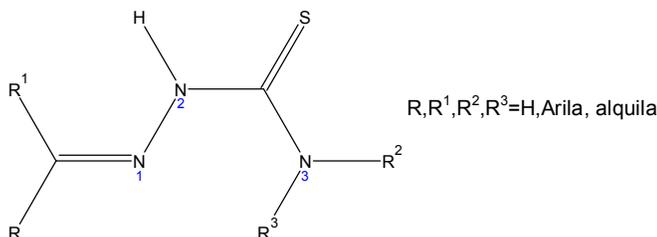


Figura 1.1- Representação da estrutura genérica de tiossemicarbazonas.

Estruturalmente, as tiossemicarbazonas não substituídas na posição N(3), apresentam o esqueleto básico C=N-NHCS-NH₂ essencialmente plano, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina. Fatores eletrônicos e estéricos contribuem para este arranjo estrutural, entre os quais o mais importante é que o átomo de enxofre na posição *anti* provavelmente possibilita a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida. Esta conformação, no entanto, pode ser mudada significativamente com a adição de um grupo substituinte na posição N(3)¹². Do ponto de vista da química de coordenação, as tiossemicarbazonas apresentam-se como ligantes versáteis, podendo se ligar aos metais tanto na forma neutra quanto na forma aniônica¹¹.

As atividades farmacológicas das tiossemicarbazonas estão frequentemente relacionadas à coordenação a um íon metálico. A coordenação promove mudanças na lipofilia, parâmetro que determina a velocidade de entrada do composto na célula. Assim, o complexo metálico pode ser mais ativo que a tiossemicarbazona livre, e alguns efeitos colaterais podem diminuir pela

⁹ H. Beraldo, D. Gambino, Mini-Rev. Med. Chem. 4 (2004) 151-165.

¹⁰ H. Beraldo, Quim. Nova, 27(3) (2004) 461-471.

¹¹ T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 977-1055.

¹² R. P. Tenório, A. J. S. Góes, J. G. Lima, A. R. Faria, A. J. Alves, T. M. Aquino, Quim. Nova 28 (6) (2005) 1030-1037.

coordenação. O complexo metálico pode ainda exibir propriedades farmacológicas que não estão presentes no ligante livre. O mecanismo de ação pode envolver a ligação do centro metálico em um sítio biológico ou o complexo metálico pode agir como um meio de ativação do ligante. Finalmente, a coordenação pode levar a uma mudança no mecanismo de ação da droga e conseqüente redução da resistência à droga⁹.

Atualmente, o único composto da classe das tiossemicarbazonas a ser empregado clinicamente é a “tioacetazona” (4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, Figura 1.2a). A tioacetazona vem sendo utilizada em associação com a isoniazida desde 1960 no tratamento da tuberculose, com o intuito de prevenir o desenvolvimento de resistência a isoniazida. Entretanto, sua ação predominantemente bacteriostática* *in vivo*, além dos efeitos colaterais como a indução de *diabetes melitus* e reações cutâneas limitam sua utilização. Nos países africanos, o uso da associação (tioacetazona + isoniazida) em pacientes co-infectados com o vírus HIV é desencorajada. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso da tioacetazona no tratamento da tuberculose é feito em sete países, que apresentam 1,5% dos casos de tuberculose no mundo. Ainda sim, o uso deste medicamento está sendo abandonado, uma vez que se faz necessário verificar se o paciente é portador do vírus HIV antes de se administrar o tratamento com a tioacetazona, diminuindo a relação custo-benefício do tratamento^{10,13}.

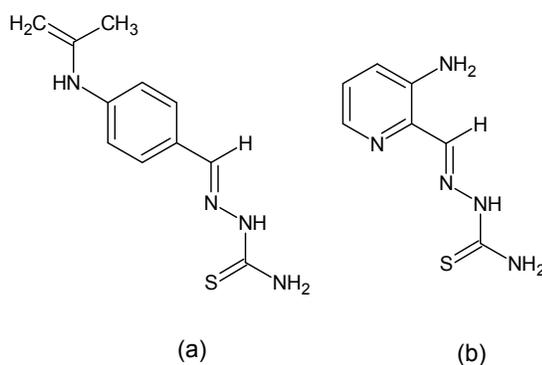


Figura 1.2- Representação das estruturas de: (a) 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (tioacetazona); (b) 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (triapina-3-AP).

A atividade antitumoral das tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas vem sendo investigada. O mecanismo de ação proposto é que essa classe de tiossemicarbazonas aja por meio de inibição da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), uma enzima envolvida na

* Atividade bacteriostática é a capacidade de deter o crescimento de determinadas bactérias, dificultando sua proliferação.

¹³ WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines (14th : 2005: Geneva, Switzerland); The selection and use of essential medicines : report of the WHO Expert Committee, 2005 : (including the 14th model list of essential medicines), pg. 25.

biossíntese do ADN, na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos⁹. A RDR está envolvida na replicação do ADN e no mecanismo de reparação celular. Alterações na atividade dessa enzima podem estar associadas a doenças e em particular ao câncer. Uma vez que a redução de ribonucleotídeos é uma etapa limitante na síntese de ADN, a inibição da RDR interrompe a produção de ADN e conseqüentemente a proliferação celular¹⁴. Isto faz da RDR um alvo biológico importante no desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral.

Um composto da classe das tiossemicarbazonas que apresenta potencial para se tornar um fármaco antitumoral é a triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, 3-AP, Fig. 1.2b). O composto demonstrou resultados promissores no combate a tipos específicos de células tumorais, tais como carcinoma de fígado M-109 e carcinoma de ovário humano A2789. A triapina encontra-se hoje em ensaios clínicos. Para o tratamento de tumores de próstata, pâncreas, rins, ovário e pulmão, os testes na fase II já foram concluídos, e para outros tipos de tumores, os testes se encontram em andamento nas fases I e II^{10,12,15}.

De fato, as tiossemicarbazonas α -(N)-heterocíclicas encontram-se entre os inibidores mais potentes da atividade da RDR, sendo até mais de mil vezes mais potentes que a hidroxauréia, um inibidor da RDR usado na clínica atualmente. No entanto, a hidroxauréia é um bloqueador enzimático fraco e tem curta meia-vida no plasma, o que a torna um agente tumoral de eficácia limitada. Além disso, há o aparecimento de células tumorais resistentes ao fármaco^{10,12}. A atividade antitumoral de tiossemicarbazonas e de seus complexos com vários metais tais como cobre, ferro, paládio, platina, zinco, ouro, bismuto, entre outros, vem sendo estudada^{7,9,10}.

A atividade antimicrobiana das tiossemicarbazonas também é extensamente investigada. Estudos demonstram que as tiossemicarbazonas inibem o crescimento de bactérias *gram*-positivas (ex: *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*), mas apresentam baixa atividade contra bactérias *gram*-negativas (ex: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). A atividade contra diferentes culturas de fungos tais como *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii*, entre outros, tem sido estudada. Em muitos casos a atividade aumenta pela coordenação aos cátions metálicos. Neste ponto, vale destacar que, em estudos anteriores, complexos de tiossemicarbazonas com bismuto(III) apresentam atividade *in vitro* contra *Helicobacter pylori*, uma bactéria responsável por distúrbios gástricos e pelo aparecimento de úlcera¹⁶.

¹⁴ J. Shao, B. Zhou, B. Chu, Y. Yen, Curr. Cancer Drug Targets 6 (2006) 409-431.

¹⁵ <http://clinicaltrials.gov> – consultado em 13/06/2011.

¹⁶ U. Dittes, R. Diemer, O. Lenz, B. K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 59 (1995) 215.

1.3- Quinolinas e Química Medicinal/Química Inorgânica Medicinal

As quinolinas são uma classe de compostos que apresentam um esqueleto aromático heterocíclico condensado (Figura 1.3).

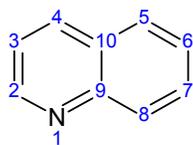


Figura 1.3 – Representação da estrutura da quinolina.

O núcleo quinolina ocorre em uma série de compostos naturais, como os alcalóides de chincona, e no esqueleto de substâncias que exibem um largo espectro de atividades biológicas. Muitos desses compostos já têm uso clínico como agentes antifúngicos, antibacterianos e antiprotozoários¹⁷.

A 8-hidroxiquinolina (Figura 1.4a) é um agente quelante monoprótico bidentado. Seus complexos, bem como o ligante livre têm atividades antisséptica, desinfetante e pesticida¹⁸. Apesar de sua toxicidade relativa, na clínica existem vários medicamentos que contêm hidroxiquinolina em sua composição, como por exemplo, o Lacto-vagin® (associação de hidroxiquinolina e tirotricina) usado no tratamento de vulvovaginites e o Senol® (sulfato de hidroxiquinolina e anestésicos) usado no tratamento de irritações e fissuras nos mamilos e auréolas dos seios.

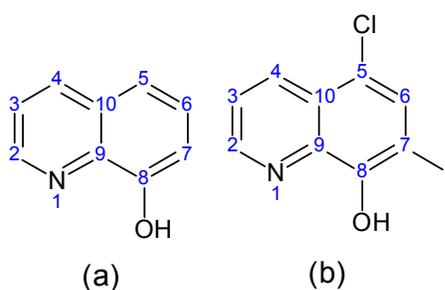


Figura 1.4- Representação das estruturas de: (a) 8-hidroxiquinolina e (b) 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol).

¹⁷ K. V. Sashidhara, A. Kumar, G. Bhatia, M. M. Khan, A. K. Khanna, J. K. Saxena, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1813–1818.

¹⁸ R. Musiol, J. Jampilek, K. Kralova, R. Richardson, D. Kalinowski, B. Podeszwa, J. Finster, H. Niedbala, A. Palka, J. Polanski, Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 1280–1288.

O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), Figura 1.4b tem atividades antifúngica e antiprotozoária, mas pode ser tóxico se administrado em altas doses¹⁹. Os primeiros relatos do uso deste medicamento no tratamento e prevenção de sigelose e amebíase foram feitos por Gholz e colaboradores em 1964²⁰. Atualmente o clioquinol é usado na clínica para tratamento de infecções cutâneas (Permut® pomada, Vioform-hidrocortisona®, Locorten®).

Vários derivados de 8-hidroxiquinolina e seus complexos metálicos vêm sendo alvos de estudos quanto à atividade antitumoral²¹. Bases de Mannich²² e bases de Schiff²³ derivadas da 8-hidroxiquinolina mostraram atividade citotóxica *in vitro* contra células de leucemia²¹, alto potencial antioxidante, além de significativa atividade antidislipidêmica^{*17}. Outro estudo de grande importância é a aplicação de derivados da 8-hidroxiquinolina como inibidores da integrase, enzima que atua no processo de replicação do vírus HIV-1^{24,25}.

Devido às suas propriedades quelantes, o clioquinol representa uma abordagem como potencial terapêutico no tratamento da Doença de Alzheimer (DA). Existem evidências de que as interações entre o peptídeo β -amilóide e o cobre, o ferro e o zinco estão associados à formação e maturação de placas senis, na fisiopatologia da DA. Portanto, agentes quelantes de metais, como o clioquinol, oferecem potencial terapêutico, como modificadores da patogenia da DA^{26,27}.

A potencial eficácia do uso do clioquinol no tratamento da DA levou a estudos da eficácia do fármaco no tratamento da Doença de Huntington (DH). Nguyen e colaboradores demonstraram que as propriedades quelantes e antioxidantes do clioquinol tornam a terapia com o composto uma alternativa no tratamento da DH²⁸.

1.4- Antimônio: usos em medicina

Há relatos da utilização de complexos antimoniais na medicina e na cosmética desde os egípcios. Atualmente o principal uso dos antimoniais é no tratamento das leishmanioses. A leishmaniose é uma doença infecciosa, causada por parasitas e é considerada endêmica em 88

¹⁹ X. Mao, A. D. Schimmer, Toxicol. Lett. 182 (2008) 1–6.

²⁰ L. M. Gholz, W. L. Arons, Am. J. Trop. Med. Hyg. 13 (1964) 396–401

²¹ E. Manoj, M. R. P. Kurup, A. Punnoose, Spectrochim. Acta A 72 (2009) 474–483.

²² Shen A-Y., Wu S-N., Chiu C-T., J. Pharm. and Pharm., 51(5), (1999) 543-548.

²³ K.V.Sashidhara, A. Kumar, G. Bhatia, M.M. Khan, A.K. Khann, J.K. Saxena, Eur. J. Med. Chem 44 (2009) 1813–1818.

* Atividade antidislipidêmica é a capacidade de diminuir o acúmulo de lipídeos no sangue.

²⁴ F.Zouhiri, M. Danet, C. Bénard, M. Normand-Bayle, J. Mouscadet, H. Leh, C.M. Thomas, G.Mbemba, J. d'Angelo, D. Desmaële, Tetrahedron Lett. 46 (2005) 2201–2205.

²⁵ K. Mekouar, J. Mouscadet, D. Desmale, F. Subra, H. Leh, D. Savour, C. Auclair, J. d'Angelo, J. Med. Chem., 41 (15) (1998) 2846-2857.

²⁶ O. V. Forlenza, Rev. Psiqu. Clín. 32 (3) (2005) 137-148.

²⁷ M. D. Vaira, C. Bazzicalup, P. Orioli, L. Messori, B. Bruni, P. Zatta, Inorg. Chem. 43 (2004) 3795-3797.

²⁸ T. Nguyen, A. Hamby, S. M. Massa, PNAS, 102(3) (2005) 11840–11845.

países do mundo, afetando principalmente as populações de baixa renda. A doença é causada pelos parasitas do gênero *Leishmania*. Mamíferos selvagens ou domesticados podem servir como reservatórios para o parasita. Os vetores da leishmaniose são mosquitos flebótomos, dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychopopygus*. Os flebótomos se infectam ao picar o animal portador da doença, sugando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecido, podendo assim transmitir o parasita ao homem através de uma picada. Clinicamente a doença pode causar lesões cutâneas ou viscerais. Basicamente existem dois tipos de leishmaniose, a leishmaniose tegumentar americana (úlcer de Bauru) e leishmaniose visceral (Calazar)²⁹.

Ainda que o uso de compostos de antimônio já fosse conhecido séculos antes da era cristã para diversos fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Alguns anos mais tarde, na Itália, foi comprovada a eficácia dessa droga no tratamento de Calazar³⁰. O tartarato de antimônio(III) e potássio ou tartarato emético, foi amplamente utilizado até o início dos anos 1900, apesar da natureza tóxica do elemento³¹.

Apesar de ser o primeiro medicamento empregado com sucesso no tratamento de leishmanioses, o uso do tartarato emético tinha várias limitações terapêuticas. Esse medicamento era administrado por via endovenosa em doses múltiplas por um período de aproximadamente um mês. Vários efeitos colaterais, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotoxicos, eram observados durante o tratamento e em muitos casos o tratamento era abandonado pelos pacientes. Em razão desses efeitos indesejáveis os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por complexos de antimônio pentavalentes. Foi proposto que antimônio(V) agiria como um pró-fármaco, sendo reduzido por tióis celulares no organismo do hospedeiro a antimônio(III), sua forma ativa e tóxica^{28,32}. No Brasil, o medicamento de primeira escolha para o tratamento de leishmanioses é o antimoniato de meglumina, contendo antimônio pentavalente³³.

Embora o principal uso dos antimoniais seja no tratamento das leishmanioses, estudos relatam o potencial citotóxico de complexos de antimônio(III) e antimônio(V) contra várias linhagens de células tumorais humana incluindo THP-1 (leucemia monocítica)^{34,35} e HeLa

²⁹ F. Frézard, C. Demicheli, R. R. Ribeiro, *Molecules* 14 (2009) 2317-2336.

³⁰ S. Rath, L. A. Trivelin, T. R. Imbrunito, D. M. Tomazela, M. N. de Jesús, P. C. Marzal, H. F. A. Junior, A. G. Tempone, *Quim. Nova*, 26(4) (2003) 550-555.

³¹ K. A. Abboud, R. C. Palenik, G. P. Palenik, R. M. Wood, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 3642-3646.

³² C. Demicheli, F. Frézard, *Cadernos temáticos de Química Nova na Escola*, N° 6 (2005)24-30.

³³ Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde Brasília - 2000 62 p. il.

³⁴ Susan Wyllie, Alan H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacology* 71 (2006) 257-267.

³⁵ K. K. Mann, K. Davison, M. Colombo, A. L. Colosimo, Z. Diaz, A. M. S. Padovani, Q. Guo, P. J. Scrivens, W. Gao, S. Mader, W. H. Miller Jr., *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 158-170.

(carcinoma cervical)^{36,37}. Na tentativa de explorar ao máximo o potencial terapêutico dos antimonialis, a atividade antimicrobiana de complexos de antimônio também vem sendo investigada. Estudos demonstram que compostos de antimônio possuem atividade contra espécies de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), gram-negativas (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) além de espécies de fungos e leveduras como por exemplo, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus Niger*^{38,39}.

1.5 - Bismuto: usos em medicina

Apesar de ser um elemento relativamente raro (é o 64º em abundância na crosta terrestre), grandes quantidade de bismuto são produzidas anualmente como subproduto do refino de cobre e estanho. Apesar de seu status de metal pesado, o bismuto é considerado seguro, já que não é carcinogênico e sua toxicidade é aceitável. Trata-se de um acentuado contraste em relação aos elementos localizados próximos a ele na tabela como arsênio, chumbo e estanho que são altamente tóxicos e sua utilização representa riscos ambientais.

O bismuto tem dois estados de oxidação principais: bismuto(III), com raio iônico de 1,03 Å e 1,17 Å para número de coordenação (NC) 6 e 8 respectivamente, e bismuto(V) com raio iônico de 0,76 Å para NC igual a 6. A forma trivalente é a mais comum e a mais estável, enquanto que a forma pentavalente é um poderoso oxidante em soluções aquosas. Bismuto(III) hidrolisa facilmente em soluções aquosas (pKa = 1,51) e tem alta afinidade de ligação com nitrogênio e oxigênio; no entanto tem maior afinidade de coordenação com grupos tiolatos (-SR)⁴⁰.

Compostos de bismuto vêm sendo usados na medicina há mais de dois séculos. O primeiro relato foi em 1786, por Louis Odier no tratamento de dispepsia. Baseados nos estudos acerca deste elemento, vários compostos de bismuto foram sintetizados e alguns já são usados em tratamentos clínicos^{41,42}. Compostos deste metal foram utilizados no tratamento de várias infecções, como sífilis, colite, no tratamento de feridas, malária, dispepsia, diarreia e úlceras pépticas^{39,40}. Dentre as atividades farmacológicas do bismuto, duas têm sido alvo de vários estudos: as atividades antimicrobiana⁴³ e antitumoral³⁴.

³⁶ E. R. T. Tiekink, *Critical Rev. Onc. Hemat.* 42 (2002) 217-224.

³⁷ S. K. Hadjidakou, I. I. Ozturk, M. N. Xanthopoulou, P. C. Zachariadis, S. Zartilas, S. Karkabounas, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1007-1015.

³⁸ H. P. S. Chauhan, A. Bakshi, Sumit Bhatiya; *Spectroch. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Artigo *in Press*.

³⁹ N. C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1176-1186.

⁴⁰ M. Mehring, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 974-1006.

⁴¹ G. G. Briand, N. Burford, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2601-2657

⁴² U. Dittes, E. Vogel, B. K. Keppler, *Coord. Chem. Rev.* 163 (1997) 345-364.

⁴³ K. Nomiya, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, N. C. Kasuga, H. Yokoyama, S. Nakano, K. Onodera, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 601-615.

O uso mais importante desses compostos é, no entanto, no tratamento de doenças do trato gastrointestinal relacionadas à bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)⁴¹. *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa de forma espiralada, que se aloja na mucosa gastrointestinal e causa danos a células epiteliais. Sua ocorrência é comum, e estima-se que metade da população mundial esteja infectada com a bactéria.

H. pylori foi associada a problemas gastrointestinais pela primeira vez em 1981 pelos pesquisadores Robin Warren e Barry J. Marshall⁴⁴, que ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2005 por seus estudos. Atualmente três compostos de bismuto são usados internacionalmente no tratamento de distúrbios gástricos: o subsalicitado de bismuto (Pepto-Bismol®, Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio, E.U.A.), o subcitrato de bismuto coloidal (CBS, De-Nol®; Síntese brocados e Yamanouchi) e o citrato de bismuto/ranitidina (RBC, Tritec® e Pylorid®, GSK)⁴⁵.

Existem controvérsias acerca da estrutura exata dos sais de bismuto empregados na clínica. De forma geral, esses compostos se apresentam como estruturas poliméricas, sendo que várias formulações já foram propostas^{40,46}. O mecanismo de ação dos complexos de bismuto(III) também não foi completamente elucidado. Um dos mecanismos propostos é que os sais de bismuto formam uma camada protetora impedindo assim que as bactérias entrem em contato com a mucosa intestinal. No entanto, estudos indicam que o bismuto é capaz de interagir com enzimas tais como álcool desidrogenase e urease, interferindo no processo de colonização da mucosa gastrointestinal pela *H. pylori*⁴⁷.

A aplicação de compostos de bismuto na terapia do câncer também vem sendo estudada. A principal delas se baseia na habilidade desses compostos de reduzir os efeitos colaterais de drogas antitumorais como a cisplatina, por exemplo, sem interferir na atividade do fármaco. Como citado anteriormente, a cisplatina é um dos antitumorais mais utilizados na clínica. Porém seus efeitos colaterais, como nefro-toxicidade, dificultam o tratamento. Estudos mostraram que a administração de subnitrato de bismuto é capaz de reduzir os efeitos colaterais da cisplatina⁴⁸.

Além do uso como coadjuvante na quimioterapia do câncer o emprego de compostos de bismuto na radioterapia tem sido alvo de investigações. ²¹²Bi (t_{1/2} = 61min) e ²¹³Bi (t_{1/2} = 46min) são radionuclídeos emissores de partículas- α capazes transferir energia de forma linear com mais eficiência do que emissores de partículas- β como ⁹⁰Y por exemplo⁴⁹. Uma grande vantagem é que ²¹²Bi e ²¹³Bi têm uma penetração curta no tecido (50-80 μ m) o que poderia

⁴⁴ <http://www.helico.com> acessada em 08-05-2011.

⁴⁵ P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain, F. Bazoli, E. Omar, D. Graham. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007 Jun; 56 (6) 772-781.

⁴⁶ W. Li, L. Jin, N. Zhu, X. Hou, F. Deng, H. Sun, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 12408-12409.

⁴⁷ N. Yang, H. Sun, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 2354–2366.

⁴⁸ N.E. Magnusson, A. Larsen, J. Rungby, M. Kruhøffer, T.F. Ørntoft, M. Stoltenberg, Cell Tissue Res. 321 (2005) 195 – 210.

⁴⁹ S. Hassfjell, M.W. Brechbiel, Chem. Rev. 101 (2001) 2019-2036.

reduzir a incidência de radiação nos tecidos adjacente ao tumor. Estudos recentes sugerem o potencial uso de ^{212}Bi como agente radioterapêutico para tumores de pequeno volume⁵⁰.

1.6. O presente trabalho

No presente trabalho foi preparada uma série de tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis, as quais apresentam dois grupos farmacologicamente ativos: a porção tiossemicarbazona e o grupo imidazol. Uma vez que tanto tiossemicarbazonas quanto derivados de imidazol mostram ação antimicrobiana⁵¹, interessou-nos investigar a atividade de moléculas que contenham as duas funções.

Complexos metálicos de tiossemicarbazonas têm sido amplamente investigados e os resultados relatados na literatura. No entanto, complexos de antimônio e bismuto desses ligantes ainda são raros, e seu perfil farmacológico permanece praticamente inexplorado.

No intuito de se investigar o potencial antitumoral dos complexos de antimônio(III) foram feitos testes de citotoxicidade contra células de leucemia HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60.Bcl-X_L, HL-60.Bcl2 (HL-60 ectopicamente expressando proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L e Bcl2, respectivamente), HL-60.BcrAbl (HL-60 ectopicamente expressando a tirosina quinase Bcr.abl) e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto). As linhagens foram escolhidas com o intuito de se fazer um estudo preliminar do mecanismo de ação dos compostos testados e de se verificar se os mecanismos de citotoxicidade envolvem apoptose celular.

Uma vez que os antimoniais possuem atividade antiparasitária, nos interessou testar a atividade dos complexos de antimônio(III) obtidos contra *Trypanosoma Cruzi*. Para completar o estudo do perfil farmacológico dos compostos obtidos foram feitos testes de atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*) e contra fungo (*Candida albicans*).

Compostos de bismuto são utilizados clinicamente em associação com antibióticos e inibidores da bomba de prótons no combate a úlceras causadas por *Helicobacter pylori*. Sabe-se que infecções por *H. pylori* podem conduzir ao aparecimento de câncer gástrico, sendo que a presença da bactéria é tida fator carcinogênico classe 1 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Assim, consideramos interessante obter complexos de bismuto de famílias de tiossemicarbazonas, os quais reuniriam um metal ativo a um ligante igualmente ativo. Os novos complexos foram testados quanto à atividade antibacteriana e quanto à atividade citotóxica/antitumoral.

⁵⁰ T. K. Nikula, M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. Wu, R. W. Kozak, K. Garmes-tani, M. W. Brechbiel, M. J. Curcio, C. G. Pippin, L. Tiffany-Jones, M. W. Geerlings Jr., O. A. Gansow, D. A. Scheinberg, J. Nucl. Med. 4 (1999) 166-176.

⁵¹ B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar, Med. Chem. Res. (2010) artigo publicado *online*.

Foram escolhidas famílias de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, de 2-benzoilpiridina, e de 2-piridinoformamida. Estudos anteriores realizados por nossa equipe indicaram que tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos metálicos apresentam perfil farmacológico interessante⁵². 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas, contendo um grupo amino em C(7), não haviam sido estudadas quanto ao perfil farmacológico. Nosso grupo tem sido o primeiro a investigar o efeito desta inovação estrutural sobre a atividade^{53,54}, e neste trabalho demos continuidade à investigação, através do estudo de seus complexos com antimônio(III) e bismuto(III). Piridino-tiossemicarbazonas contendo grupos toluil em N(4) têm sido investigadas pelo nosso grupo em razão de sua importante atividade citotóxica contra células tumorais humanas^{8,52}. No presente trabalho, propusemo-nos a investigar o efeito da coordenação a antimônio(III) e bismuto(III) sobre o perfil farmacológico desta série de compostos.

Finalmente, complexos de antimônio(III) e bismuto(III) foram também obtidos com derivados de 8-hidroxiquinolina. Como já mencionamos, o núcleo quinolina ocorre no esqueleto de vários compostos empregados clinicamente como antimicrobianos. Uma vez que o esqueleto já é aprovado para uso clínico, os complexos, se mostrarem atividade, teriam uma maior facilidade em tornar-se candidatos a fármacos.

⁵² K. O. S. Ferraz, G. M. M. Cardoso, C. M. Bertollo, E. M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C. L. Zani, I. C. Mendes, M. A. Gomes, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 315–321.

⁵³ I. C. Mendes, F. B. Costa, G. M. de Lima, J. D. Ardisson, I. Garcia-Santos, A. Castiñeiras, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 1179–1185.

⁵⁴ I. C. Mendes, J. P. Moreira, J. D. Ardisson, R. G. dos Santos, P. R. O. da Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1454-1461.

Capítulo 2 - Parte Experimental

2.1- Equipamentos e Procedimentos

- **Determinação de temperatura de fusão**

As temperaturas de fusão foram determinadas em um equipamento Mettler FP 90.

- **Determinação de massas**

As massas foram determinadas em uma balança Gehaka, modelo AG 200, precisão 10mg.

- **Análise Elementar**

As análises foram feitas em um aparelho Perkin Elmer, modelo CHN-2400.

- **Análises Térmicas**

Foi utilizada uma termobalança Mettler TA-4000 com analisador TG50. Foi utilizada de ar com razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25-800°C.

- **Análises Condutimétricas**

As medidas de condutividade dos complexos foram realizadas em um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica de constante 0,088cm⁻¹ do mesmo fabricante. Foram utilizadas soluções de DMF de concentração na ordem de 10⁻³ a 10⁻⁴ mol.L⁻¹.

- **Espectros de Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX200 - (200 MHz) e foram registrados usando-se TMS ($\delta=0$) como padrão interno. Os solventes utilizados e os experimentos realizados estão descritos em cada capítulo.

- **Espectros de Infravermelho**

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX. As medidas foram registrados usando-se KBr, na região de 650-4000 cm⁻¹, e CsI como suporte, na região de 200-650 cm⁻¹

- **Estruturas de Cristalográficas**

As estruturas foram determinadas em colaboração dos pesquisadores: Dr. Nivaldo Speziali (Departamento de Física, UFMG), Dra. Isolda Maria de Castro Mendes (Escola de Belas Artes,

UFMG), Dra. Solange M. Wardell (Fiocruz, Far-Manguinhos Rio de Janeiro). Detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritas nos capítulos.

- **Reagentes**

Todos os reagentes usados foram de alto grau de pureza. As procedências dos reagentes foram as seguintes: tiossemicarbazidas (Merck e Aldrich), $N_2H_4H_2O$ (hidrazina) (Aldrich), tricloreto de antimônio (Aldrich), tricloreto de bismuto (Aldrich), 1*H*-imidazol-5-carbaldeído (Aldrich), 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (Aldrich), 4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona (Aldrich), 8-hidroxiquinolina (Aldrich), 5-Cl-8-hidroxiquinolina (Aldrich), 5-cloro-7-iodo-5-hidroxiquinolina (clioquinol) (Aldrich), metanol (Synth), etanol (Synth), álcool isopropílico (Synth), éter etílico (Grupo Química), acetona (Quimex), DMF (Synth) e (Merck), DMSO (Synth).

2.2 - Obtenção de ligantes e complexos

As tiossemicarbazonas e seus complexos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar e seus espectros RMN de 1H , ^{13}C , DEPT 135 e mapas de contorno COSY, HMQC e HMBC e de absorção na região do infravermelho.

2.2.1 - Obtenção de 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT) (1) e N(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh) (2)

As tiossemicarbazonas foram obtidas dissolvendo-se 1 mmol de 4(5)-imidazol carboxaldeído em 10,0 mL de etanol, com posterior adição de 1 mmol de tiossemicarbazida. A mistura foi mantida sob refluxo por 6 horas. A reação foi mantida sob refrigeração por 24 horas; o sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico e secado em estufa. O derivado fenilado foi obtido usando-se o mesmo método, através da reação de 4(5)-imidazol carboxaldeído com a 4-feniltiossemicarbazida.

2.2.2 – Obtenção de 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT) (3), N(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTM) (4) e N(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTPh) (6)

As tiossemicarbazonas foram obtidas dissolvendo-se 1 mmol de 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído em 10,0 mL de etanol com posterior adição de 1 mmol de tiossemicarbazida. A mistura foi mantida sob refluxo por 6 horas. A reação foi mantida sob refrigeração por 24 horas; o sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico e secado em estufa.

Os derivados fenilado e metilado foram obtidos usando-se o mesmo método, através da reação entre 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído com 4-feniltiossemicarbazida e 4-metil-3-tiossemicarbazida, respectivamente.

2.2.3 – Obtenção de 4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcT) (7), *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTM) (8) e *N*(5)-fenil-4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTPh) (9)

As tiossemicarbazonas foram obtidas dissolvendo-se 1 mmol de 4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona em 10,0 mL de etanol com posterior adição de 1 mmol de tiossemicarbazida. A mistura foi mantida sob refluxo por 6 horas. A reação foi mantida sob refrigeração por 24 horas; o sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico e secado em estufa.

Os derivados fenilado e metilado foram obtidos usando-se o mesmo método, através da reação de 4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona com 4-feniltiossemicarbazida e 4-metil-3-tiossemicarbazida, respectivamente.

2.2.4 - Obtenção de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH), *N* (4)-metil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4M) e *N*(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph)

As tiossemicarbazonas foram obtidas de acordo com método já utilizado por outros membros do grupo^{1,2}.

Dissolveu-se 1 mmol de 2-benzoilpiridina em 10,0 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) com posterior adição de 1 mmol de BF₃. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 10 minutos. Então, foi adicionado 1 mmol da tiossemicarbazida desejada e após 6 horas sob refluxo a mistura reacional foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase aquosa foi descartada e a fase em diclorometano foi concentrada para a precipitação do ligante. O precipitado formado foi filtrado, lavado com diclorometano e éter etílico, depois secado em estufa.

2.2.5 - Obtenção de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH), *N*(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4M) e *N*(4)-fenil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4Ph)

¹A. E. Graminhaa, C. Rodrigues, A. A. Batista, L. R. Teixeira, E. S. Fagundes, H. Beraldo, Spectrochim. Acta Part A 69 (2008) 1073–1076.

² A. P. Rebolledo, G. M. Lima, N. L. Speziali, O. E. Piro, E. E. Castellano, J. D. Ardisson, H. Beraldo, J. Organometall. Chem. 691 (2006) 3919–3930.

As sínteses foram feitas de acordo com método descrito na literatura³.

A 30,0 mL de metanol seco adicionou-se 8 mmol de sódio metálico, sob agitação. Após a dissolução, acrescentou-se 48 mmol de 2-cianopiridina, e a solução foi agitada por meia hora. Depois da redução da 2-cianopiridina, adicionou-se, em pequenas quantidades, durante meia hora, 48 mmol da tiossemicarbazida desejada. A mistura foi deixada em refluxo por 4h e o sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, depois secado em estufa.

2.2.6 - Obtenção de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT)

As tiossemicarbazonas foram obtidas em duas etapas: primeiramente, preparou-se a hidrazona de 2-acetilpiridina adicionando-se hidrazina (15 mmol) em 50,0 mL de etanol sob leve agitação e aquecimento. Em seguida, acrescentou-se 2-acetilpiridina (15 mmol); a mistura foi mantida em refluxo por aproximadamente 7h. O produto foi isolado deixando-o na geladeira até a cristalização, e em seguida, tratado com éter etílico.

Na segunda etapa, as tiossemicarbazonas foram preparadas pela adição de 3 mmol do toluilisotiocianato desejado (*orto*, *meta* ou *para*) em 20,0 mL da solução etanólica de hidrazona (3 mmol). As misturas foram deixadas em refluxo por mais 24h. Os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com éter etílico e secados sob vácuo.

2.2.7 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridinas tiossemicarbazonas: (2-benzoilpiridinatiosemicarbazona(hidroxo)(oxo)bismuto(III)) [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), (*N*(4)-metil-2-benzoilpiridinatiosemicarbazona)triclوروبismuto(III)) [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) e (*N*(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazonato)diclوروبismuto(III)) [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] (3).

1 mmol do ligante desejado foi dissolvido em 10,0 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 1 mmol de BiCl₃, no estado sólido. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.2.8 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas: (2-benzoilpiridinatiosemicarbazonato)diclороantimônio(III)) [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (4), (*N*(4)-metil-2-benzoilpiridinatiosemicarbazona)triclороantimônio(III) dihidratado) [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (5) e (*N*(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazonato)diclороantimônio(III)) [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (6).

³ I. C. Mendes, F. B. Costa, G. M. de Lima, J. D. Ardisson, I. Garcia-Santos, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 1179–1185.

1 mmol do ligante desejado foi dissolvido em 10,0 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 1 mmol de SbCl_3 , no estado sólido. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.2.9 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) com 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas: [(dicloro-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)bismuto(III)], $[\text{Bi}(2\text{Am}4\text{DH})\text{Cl}_2]$ (1), [(N(4)-metil-2-piridinoformamidatiossemicarbazona) *(N(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazonato)* pentacloro dibismuto(III)], $[\text{Bi}_2(\text{H}2\text{Am}4\text{M})(2\text{Am}4\text{M})\text{Cl}_5]$ (2) e [(dicloro-N(4)-fenil-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)bismuto(III)]diidratado, $[\text{Bi}(2\text{Am}4\text{Ph})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3).

1 mmol do ligante desejado foi dissolvido em 10,0 ml de etanol e foi adicionado 1 mmol do sal BiCl_3 , no estado sólido. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.2.10 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) com 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas: [(dicloro-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)antimônio(III)], $[\text{Sb}(2\text{Am}4\text{DH})\text{Cl}_2]$ (4) e [(dicloro-N(4)-metil-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)antimônio(III)], $[\text{Sb}(2\text{Am}4\text{M})\text{Cl}_2]$ (5). Para o derivado N(4)-fenil ($\text{H}2\text{Am}4\text{Ph}$) foram obtidos dois complexos: [(dicloro-N(4)-fenil-triazo)antimônio(III)] $[\text{Sb}(\text{H}2\text{Triazo}4\text{Ph})_2\text{Cl}_3]$ (6) e μ -tricloroantimônio(III)bis[(dicloro-N(4)-fenil-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)antimônio(III)] $\{[\text{Sb}(\text{Am}4\text{Ph})\text{Cl}_2]_2\text{SbCl}_3\}$ (7).

Os complexos $[\text{Sb}(2\text{Am}4\text{DH})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(2\text{Am}4\text{M})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}(\text{H}2\text{Triazo}4\text{Ph})_2\text{Cl}_3]$ foram obtidos dissolvendo-se 1 mmol do ligante desejado em 10,0 ml de etanol com posterior adição de 1 mmol do sal SbCl_3 , no estado sólido. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 4 horas.

O complexo $\{[\text{Sb}(\text{Am}4\text{Ph})\text{Cl}_2]_2\text{SbCl}_3\}$ foi obtido pela mesma metodologia descrita acima reagindo 1 mmol do ligante $\text{H}2\text{Am}4\text{Ph}$ com 1,2 mmol do sal SbCl_3 .

Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com etanol e éter etílico, e secados em estufa.

2.2.11 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas: dicloro(N(4)-orto-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazonato)bismuto(III) $[\text{Bi}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2]$ (1), dicloro(N(4)-meta-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazonato)bismuto(III) $[\text{Bi}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]$ (2) e dicloro(N(4)-para-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazonato)bismuto(III) $[\text{Bi}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}_2]$ (3).

1 mmol do ligante desejado foi dissolvido em 10,0 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 1 mmol de BiCl₃, no estado sólido. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.2.12 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas: dicloro(*N*(4)-orto-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato) antimônio(III) [Sb(2Ac4oT)Cl₂] (4), dicloro(*N*(4)-meta-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato) antimônio(III) [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5) e dicloro(*N*(4)-para-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato) antimônio(III) [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (6).

1 mmol do ligante desejado foi dissolvido em 10,0 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 1 mmol de SbCl₃, no estado sólido. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.2.13 - Obtenção dos complexos de bismuto(III) com 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-Cl-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-5-hidroxiquinolina (clioquinol) (HQI): (di-μ-oxo)bis(8-hidroxiquinolinato)bismuto(III) [Bi(QN)O]₂.0,25EtOH (1), (di-μ-oxo)bis(5-cloro-8-hidroxiquinolinato)bismuto(III) diidratado [Bi(QC)O]₂.2H₂O (2) e bis(5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolinato)dicloro)bismuto(III) triidratado, [Bi(QI)₂Cl₂].3H₂O (3)

3,00 mmol do ligante desejado foram dissolvidos em 10,0 mL de etanol e 1 mmol do sal (BiCl₃) foram adicionados na forma de pó. A mistura foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.2.14 - Obtenção dos complexos de antimônio(III) com 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-Cl-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-5-hidroxiquinolina clioquinol (HQI): (8-hidroxiquinolina)(8-hidroxiquinolinato)(cloro)antimônio(III) [Sb(QN)₂Cl] (4), bis(5-cloro-8-hidroxiquinolinato)(cloro)antimônio(III), [Sb(QC)₂Cl].EtOH (5) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolinato)(cloro)antimônio(III) [Sb(QI)₂Cl] (6).

3,00 mmol do ligante desejado foram dissolvidos em 10,0 mL de etanol e 1 mmol do sal (SbCl₃) foram adicionados na forma de pó. A mistura foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente por 4 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico, e secado em estufa.

2.3 - Espectrometria de massas por ionização por eletrospray (ESI-MS) e espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

As análises foram feitas em colaboração com o Prof. Rodiney Augusti, Departamento de Química, UFMG.

As análises foram feitas em um espectrômetro de massas LCQFleet (ThermoScientific, San Jose, CA) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e obtidas no modo positivo. Os espectros foram obtidos em uma média de 50 scans, de 0,2 s cada. As amostras foram introduzidas por injeção direta, com fluxo de 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura do capilar foi de 285°C, utilizando-se N_2 como gás de arraste. A voltagem do spray foi de 5,0 kV e a voltagem do capilar foi de -38 V.

Para os experimentos de espectrometria de massas seqüencial (MS/MS), os íons precursores foram primeiro isolados com “*ion trap*” e depois fragmentados por dissociação induzida por colisão direta (CID) usando gás hélio. A energia de colisão foi ajustada para obter os íons desejados.

2.4 – Avaliação da atividade farmacológica

2.4.1- Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de macrodiluição

Os testes de atividade antibacteriana e antifúngica pelo método de macrodiluição em série foram realizados em nosso laboratório⁴.

Os testes de sensibilidade foram realizados seguindo os padrões do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁵. Cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* foram inoculadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e cepas do fungo *Candida albicans* em caldo Mueller Hinton e incubadas a 37° C por 18 a 24 h.

A efetividade antimicrobiana foi determinada por diluições sucessivas em tubos contendo 1 mL BHI ou Mueller Hinton, os quais foram inoculados com 100 μL de cultura com turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland⁵, em concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das substâncias testadas. Como controle positivo foi usado a bactéria/ou o fungo no meio de cultura; no controle negativo foi usado a bactéria/ou o fungo, o meio de cultura e o antibiótico fluconazol para *Candida albicans* e tetraciclina para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. 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.

⁴ J. Pernak, J. Rogoza, I. Mirska, Eur. J. Med. Chem. 36 (2001) 313.

⁵ National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Pennsylvania, USA, (2002).

2.4.2 – Avaliação de Atividade antifúngica pelo método de microdiluição

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

Fungos filamentosos, *Cladosporium cladosporioides* (LABB 6) e *Aspergillus flavus* (LABB 44) foram obtidos no Biotechnology and Bioassays Laboratory (LABB, MG, Brasil) e mantidos em ágar de batata (ADB) sob refrigeração a 7 °C. As cepas de candida, *Candida glabrata*(ATCC 2001) e *Candida albicans*(ATCC 18804) foram mantidos em meio BHI (infusão de cérebro e coração). Para realização dos experimentos, os fungos foram cultivados em ADB ou BHI até esporulação. Os esporos foram coletados e suspensos em água esterilizada, contados em câmara de Neubauer e diluídos de forma a se obter uma suspensão com concentração final de 5×10^3 esporos/mL. A triagem inicial foi feita em micro placas, para todos os compostos em uma concentração de 100 µg/poço (em DMSO). A concentração máxima de DMSO não ultrapassou 2%. Controles positivos (inóculo mais meio de cultura) e negativo (inóculo mais composto de referência nistatina) foram feitos simultaneamente. Os compostos que mostraram atividade na etapa de triagem foram testados em uma série de micro diluição em 12 concentrações (250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24 2 0.12 µg), em duplicata. A avaliação da inibição foi feita em um leitor de placas TP-reader (Thermoplate, Brazil). O valor da concentração inibitória mínima (CIM) foi definido como a menor concentração do composto que mostra inibição de 100% do crescimento do fungo, após o tempo de incubação (48 h). Os valores de CIM₅₀ foram definidos e expressos como a mais baixa concentração dos compostos capaz de inibir 50% do crescimento do fungo. Todos os experimentos foram realizados seguindo o procedimento de Zacchino e Gupta⁶.

2.4.3 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana

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

- **Materiais**

Cisplatina, [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazol] (MTT), RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), L-glutamine, penicilina e estreptomina foram compradas na Gibco (Grand Island, NY).

⁶ S. A. Zacchino, M. P. Gupta, Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. Rosario. Corpus Editorial y Distribuidora (2007) 95-99.

- **Linhagens celulares**

Foram utilizadas células de leucemia HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60.Bcl-X_L, HL-60.Bcl2 (HL-60 ectopicamente expressando proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L e Bcl2, respectivamente), HL-60.Bcr.Abl (HL-60 ectopicamente expressando a tirosina quinase Bcr.abl) e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto).

Todas as linhagens de célula foram mantidas na fase de crescimento logarítmica em meio RPMI-1640 suplementado por 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e enriquecido com 2mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas a 37°C em uma incubadora com 5% CO₂ e 95% ar.

- **Avaliação do efeito citotóxico dos compostos contra linhagens de células de leucemia humana.**

As diferentes células foram inoculadas em densidade celular de 50.000 células por poço. As placas foram pré-incubadas por 24 hrs a 37 °C a fim de permitir a adaptação das células antes da adição dos compostos a serem testados. A triagem foi feita com soluções em concentração de 10 µM contendo no máximo 0,1% de DMSO. Após a adição dos compostos, as placas foram incubadas por 48 horas em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Grupos de controle foram usados incluindo células tratadas com soluções de 0,1% de DMSO (controle negativo) e 10µM de cisplatina (controle positivo). A viabilidade celular foi medida pelo método MTT. Os compostos que mostraram inibição do crescimento acima de 50% na fase de triagem foram testados em uma série de micro diluições com concentrações variando entre 1x10⁻⁵ - 1x10⁻¹¹M. Os valores de IC₅₀ foram determinados graficamente através da obtenção de curvas dose-resposta utilizando-se o programa Prima 5 (GraphPad Software Inc.). Todos os testes foram feitos em triplicas, em três experimentos independentes.

- **Avaliação da viabilidade celular através do método MTT**

O método MTT é um ensaio de padrão colorimétrico, onde a atividade mitocondrial é medida pela formação de formazan, produto da redução de sais de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais, que somente ocorre em células viáveis⁷. Após 4 horas de incubação com as soluções de teste, 20 µL de solução de MTT (5mg/mL em solução salina) foram adicionados a cada poço, o

⁷ T. Mosmann, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55-63.

sobrenadante foi removido e 200 µL de uma solução 0,04M de HCl em álcool isopropílico foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. A densidade ótica (DO) foi medida em um espectrofotômetro a 570 nm. O meio de cultura sem a presença de compostos foi utilizado como controle (branco) e o meio cultura contendo 0,1% de DMSO foi usado como controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de proliferação celular usando como comparação a solução controle de 0,1% de DMSO e foram calculados de acordo com a expressão: viabilidade (%) (média DO sç de teste – média DO sç 0,1% de DMSO)/média DO branco) x 100⁸.

- **Marcação de ADN e análise por citometria de fluxo**

A determinação da fase do ciclo celular e quantificação da fragmentação de ADN (conteúdo de ADN subdiploide) foi realizada pelo teste com Iodeto de Propídeo (IP) de acordo com método proposto por Nicolletti *et al.*⁹. Células HL-60 foram tratadas com uma solução 50 µM dos compostos de teste e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas, ressuspensas em uma solução hipotônica de fluocromo (50 µM/mL IP em 0,1% citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100) e incubadas a 4°C por 4 h. A fluorescência do iodeto de propídeo foi medida utilizando-se um citômetro de FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.). Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo software (TreeStar Inc, CA).

- **Avaliação da ativação de caspases***

A ativação de caspase foi medida através do pré-tratamento com benzil-oxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK), um inibidor de caspase de largo espectro. Nos ensaios de fragmentação de ADN, as células foram incubadas por 40 minutos com uma solução 40 µM de Z-VAD-FMK (Biomol, Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) antes de serem tratadas com as soluções de teste em concentração 50 µM. Após 24 horas de incubação, o conteúdo de ADN foi medido de acordo com procedimento descrito no item acima. Culturas tratadas com DMSO (0,05%) foram usadas como controle.

A ativação de caspase-3 foi determinada utilizando-se o kit EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 (Molecular Probes, USA). As células foram tratadas com tampão de lise (1,5 mL of 200 mM TRIS, pH 7,5, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,2% TRITON™X-100) e incubadas em gelo por trinta minutos. As células lisadas foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. As microplacas foram preparadas adicionando-se em cada poço 50 µL da solução sobrenadante e 50 µL da solução do composto de teste

⁸ E. Ulukaya, M. Colakogullari, E. J. Wood, *Exp. Chem.* 50 (2004) 43-50.

⁹ I. Nicoletti, G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, *J. Immunol. Meth.* 139 (1991) 271-279.

* Caspases são um grupo de cisteína-proteases essenciais na apoptose celular, um dos principais tipos de morte celular programada durante o desenvolvimento e em outras fases da vida adulta.

com 200 μ M de Z-DEVD-AMC (benziloxycarbonil-7-amino-4-metilcumarina). As amostras foram incubadas em ambiente escuro a temperatura ambiente por trinta minutos. Após incubação, as placas foram analisadas em um fluorímetro (Cary Eclipse, Varian, USA) nos modos de excitação e emissão em comprimentos de onda 342 e 482 nm, respectivamente.

2.4.4 – Avaliação da atividade anti *Trypanosoma cruzi*

- **Animais**

Camundongos machos do tipo BALB/c (6-8 semanas de vida) foram criados no biotério da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). Os animais foram sacrificados e tratados de acordo com comissão de ética para experimentos com animais da Fundação Oswaldo Cruz.

- **Obtenção das células de baço**

Células de baço foram obtidas de acordo com procedimento descrito na literatura.¹⁰. Após eutanásia do animal com gás CO₂, as células de baço de cada animal foram removidas assepticamente e colocadas em tubos falcon contendo meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (meio completo). As células foram transferidas para uma placa de petri e maceradas. As células suspensas foram transferidas para um tubo falcon contendo 10 mL de meio incompleto e centrifugadas a 4°C por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio RPMI completo. Uma alíquota de cada suspensão foi separada, diluída em azul de tripano e quantificada em câmara de Neubauer onde a viabilidade celular foi avaliada.

- **Teste de citotoxicidade *in vitro***

A citotoxicidade dos compostos foi determinada usando culturas de esplenócitos de BALB/c (6 x 10⁵ cells.poço⁻¹) em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 50 μ g.mL⁻¹ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil). Cada composto foi avaliado em seis concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μ g.mL⁻¹), em triplicata, em dois ensaios independentes. As culturas foram incubadas na presença de ³H-timidina (Amersham Biosciences) (1 μ Ci poço⁻¹) por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após esse período, as placas foram analisadas para determinar o conteúdo de incorporação de ³H-timidina ([³H]TdR) usando um contador de radiação- β (β -matrix 9600, Packard). A citotoxicidade dos compostos foi determinada comparando a porcentagem de incorporação ³H-

¹⁰ V. R. A. Pereira, V. M. B. Lorena, A. P. G. Silva, E. M. Coutinho, E. D. Silva, A. G. P. Ferreira, P. Miranda, M.A. Krieger, S. Goldenberg, M. B. P. Soares, R. Correa-Oliveira, Y. M. Gomes, Parasitol 129 (2004) 563-570.

timidina (como indicador de viabilidade celular) pelas células tratadas com os compostos de teste com relação a células não tratadas. As concentrações não-tóxicas foram definidas como aquelas de causam 30% ou menos de redução da incorporação de ^3H -thimidina em relação aos controles.

- **Avaliação da atividade anti *Trypanosoma cruzi***

Culturas de *T. cruzi* na forma epimastigotas (cepa Y) foram cultivadas a 26°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose médium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicina. Parasitas ($1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) foram incubados com e sem soluções dos compostos a serem testados. O crescimento celular foi determinado 11 dias depois da incubação pela contagem de células viáveis através de leitura em um hemacitômetro. Os testes foram feitos em triplicata.

Para determinar os valores de IC_{50} , culturas de *T. cruzi* foram incubadas em soluções dos compostos em concentrações variadas. A viabilidade celular foi analisada após 11 dias de incubação conforme procedimento descrito acima. O cálculo dos valores de IC_{50} foi feito usando regressão não-lienar no programa Prisma (PRISM 4.0 GRAPHPAD). Cepas Y de *T. cruzi* na forma tripomastigota foram obtidas através do sobrenadante de culturas de células Vero a 37 °C. As células ($4 \times 10^5 \text{ .poço}^{-1}$) foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina. Os parasitas viáveis foram contados em um hemacitômetro 24 horas após a incubação com os compostos de teste, através da coloração com azul de tripano. A porcentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas.

Capítulo 3 – Tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis

3.1 -Tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis

Foram obtidas oito tiossemicarbazonas derivadas de imidazol: 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT) **(1)**, *N*(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh) **(2)**, 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT) **(3)**, *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzTM) **(4)**, *N*(5)-fenil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzTPh) **(5)**, 4-(1*H*-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcT) **(6)**, *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTM) **(7)** e *N*(5)-fenil-4-(1*H*-imidazol-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcTPh) **(8)**, Figura 3.1. As sínteses foram realizadas de acordo com procedimentos descritos nas seções 2.2.1 a 2.2.3. As tiossemicarbazonas foram obtidas pela reação de condensação do aldeído ou cetona derivado de imidazol com a tiossemicarbazida apropriada (Figura 3.2).

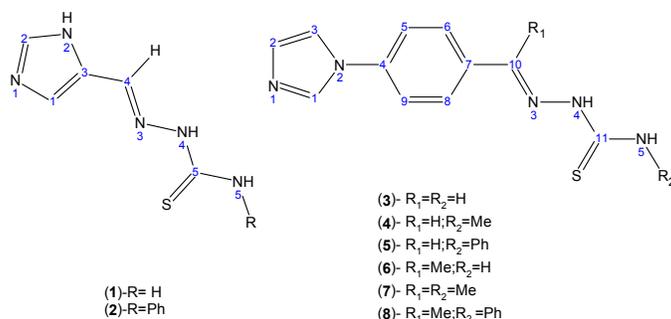


Figura 3.1 – Representação da estrutura genérica das tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.

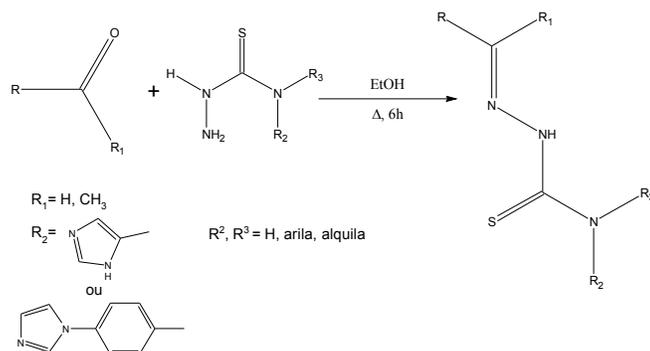


Figura 3.2 – Esquema de síntese das tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.

Rendimentos das reações, temperaturas de fusão, fórmulas moleculares e massas molares dos compostos estão descritos na Tabela 3.1. Os rendimentos das reações foram satisfatórios, exceto das reações de obtenção de ImT **(1)** e ImTPh **(2)**, tornando as sínteses desses dois compostos inviáveis. Os valores das temperaturas de fusão de **(3-8)** sugerem que existe maior interação entre as moléculas das tiossemicarbazonas não substituídas do que entre os derivados *N*(5)-metil e *N*(5)-fenil substituídos, o que pode ser explicado pelo aumento volume do grupo ligado no nitrogênio terminal *N*(5), que dificulta o empilhamento das moléculas no estado sólido. As temperatura de fusão compostos ImT **(1)** e ImTPh **(2)** não seguem esse comportamento.

Tabela 3.1 - Temperaturas de fusão, massas molares, fórmulas moleculares, rendimentos de reações e análise elementar (valores teóricos em parêntesis) para tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.

Composto	P.F (°C)	M.M. (g.mol ⁻¹)	Fórmula molecular	Rendimento (%)	Análise elementar		
					% C	%H	%N
ImT (1)	201,6-203,4	169,21	C ₅ H ₇ N ₅ S	10	32,20 (35,49)	4,04 (4,17)	40,01 (43,39)
ImTPh (2)	218,9-21,2	245,30	C ₁₁ H ₁₁ N ₅ S	12	53,96 (53,86)	4,52 (4,52)	28,58 (28,55)
4ImBzT (3)	241,4-45,5	245,30	C ₁₁ H ₁₁ N ₅ S	96	53,68 (53,86)	4,19 (4,52)	28,55 (28,55)
4ImBzTM (4)	204,5-206,9	259,33	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ S	76	56,08 (55,98)	4,93 (5,05)	26,95 (27,01)
4ImBzTPh (5)	194,0-197,1	321,340	C ₁₇ H ₁₅ N ₅ S	71	63,03 (63,53)	4,70 (4,70)	21,82 (21,79)
4ImAcT (6)	249,0-251,5	259,33	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ S	83	55,31 (55,58)	4,98 (5,05)	27,43 (27,01)
4ImAcTM (7)	214,5-215,9	273,36	C ₁₃ H ₁₅ N ₅ S	76	57,17 (57,12)	5,57 (5,53)	25,55 (25,62)
4ImAcTPh (8)	191,0-192,1	335,423	C ₁₈ H ₁₇ N ₅ S	70	64,39 (64,45)	5,98 (5,11)	20,60 (20,88)

Os sinais dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135 dos compostos são apresentados nas Tabelas 3.2 a 3.7. O esquema de numeração utilizado para atribuição dos sinais são apresentadas acima de cada tabela. Todos os espectros foram adquiridos em DMSO- d_6 .

Para tiossemicarbazonas derivadas de 1*H*-imidazol-5-carbaldeído, ImT (**1**) e ImTPh (**2**), foram observados sinais devidos à formação de isômeros configuracionais *Z* e *E* (Figura 3.3). A formação desses isômeros ocorre frequentemente nas tiossemicarbazonas¹. Observou-se ainda evidência de tautomerismo do tipo tiona-tiol no derivando N(5)-fenil, uma vez que nos espectros ^{13}C RMN deste composto há três sinais para cada carbono (Figura 3.4) e que a integração nos espectros ^1H RMN é compatível com a presença de três espécies de cada hidrogênio. O sinal de C-S em frequência mais baixa é atribuído a um C-S de tiol^{2,3}. Não foi possível distinguir isômeros *Z* e *E* para a forma tiol. De fato, a simulação do espectro teórico, feita através do programa ACD/Labs 6.0 mostra um único sinal para os carbonos para a forma tiol (Figura 3.5).

De forma geral os sinais de ^1H no isômero *Z* de (**1**) e (**2**) se encontram em campo mais baixo. Este comportamento é mais pronunciado para o sinal de N(4)-H, que se encontra em δ 13,21 ppm no isômero *Z* e em δ 11,43 ppm para o isômero *E* em (**1**) e em δ 13,41 ppm no isômero *Z* e em δ 11,78 ppm para o isômero *E* em (**2**).

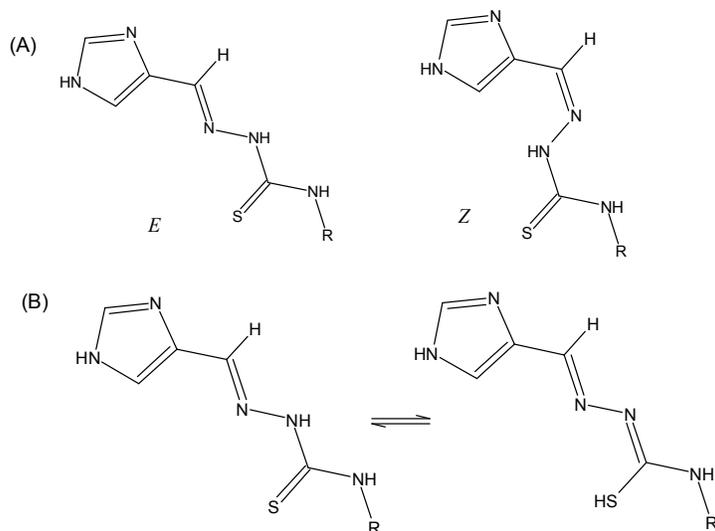


Figura 3.3 - (A) Isomêros configuracionais *Z* e *E* e (B) formas tautoméricas tiona-tiol para as tiossemicarbazonas ImT R = H (**1**) e ImTPh R = Ph (**2**).

¹ M. A. B. Bastos, A. F. C. Alcântara, H. Beraldo, Tetrahedron, 61 (2005) 7045-7053.

² A. G. Quiroga, J. M. Pérez, I. L. López-Solera, J. R. Msaguer, A. Luque, P. Román, A. Edwards, C. Alonso, C. Navarro-Raninger, J. Med. Chem., 41 (1998) 1399-1408.

³ M. C. Rodríguez-Argüelles, E. C. López-Silva, J. Sanmartín, A. Bacchi, C. Pellizi, F. Zani, Inorg. Chem. Acta, 357 (2004) 2543-2552.

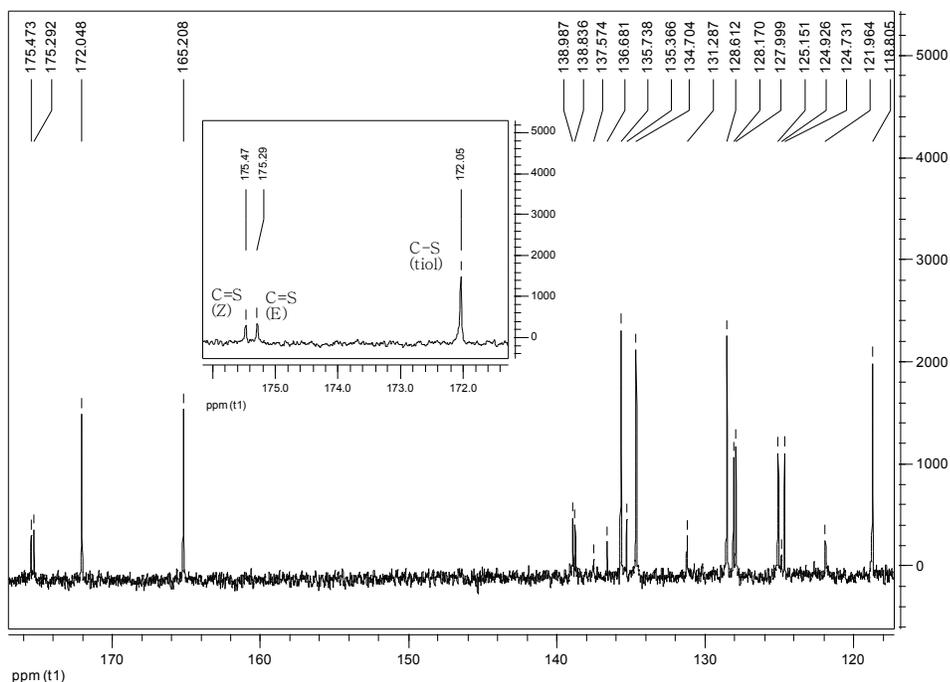


Figura 3.4 - Espectro de ^{13}C RMN (DMSO-d_6) do composto (2) na região entre δ 180,00 - δ 115,00 ppm.

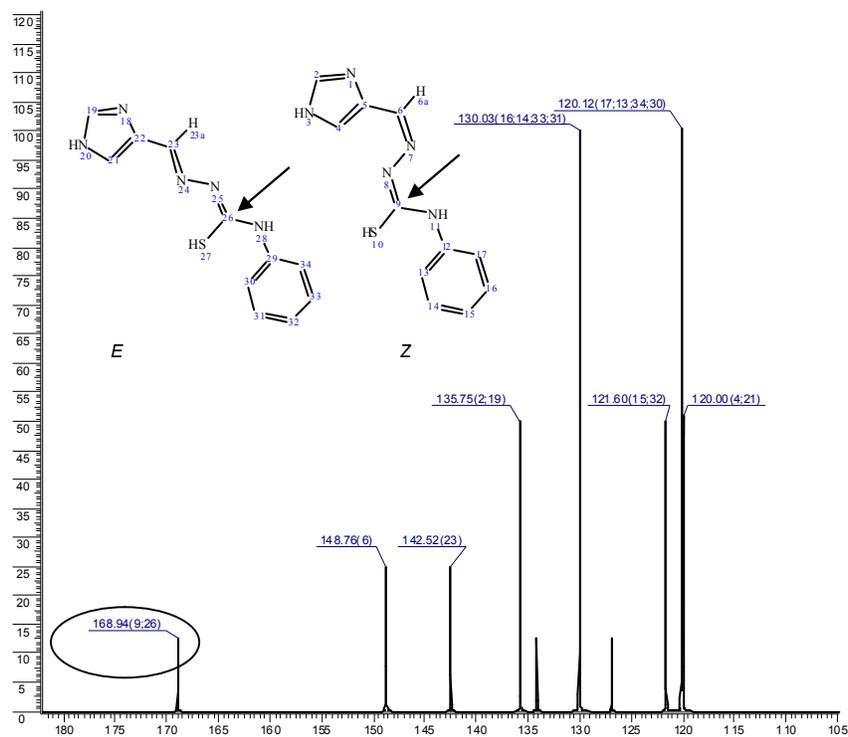


Figura 3.5 – Simulação do espectro de ^{13}C RMN dos isômeros *E* e *Z* para forma tiol do (2). A numeração das estruturas é gerada automaticamente pelo programa e não corresponde ao esquema de numeração utilizado na tese.

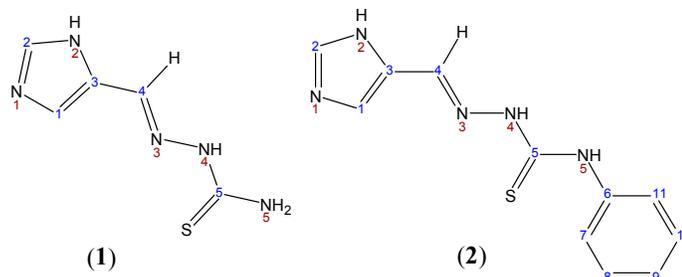


Figura 3.6 - Esquema de numeração das estruturas para atribuição dos sinais de RMN de ImT (1) e ImTPh (2).

Tabela 3.2 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de 1*H*-imidazol-5-carbaldeído (DMSO- d_6).

Atribuições	ImT (1) $\delta(\text{ppm})$			M	ImTPh (2) $\delta(\text{ppm})$			M
	<i>E</i>	<i>Z</i>	tiol		<i>E</i>	<i>Z</i>	tiol	
H(1)	7,73	7,47	-	s	7,75	7,75	7,87	S _{sobr.}
H(2)	7,28	8,01	-	s	7,35	7,89	7,87	S _{sobr.}
H(4)	8,08	7,86	-	s	7,87	8,07	8,79	s
H(7)	-	-	-	-	7,86	7,86	7,35	t
H(8)	-	-	-	-	7,61	7,61	7,61	m
H(9)	-	-	-	-	7,17	7,17	7,17	t
H(10)	-	-	-	-	7,61	7,61	7,62	m
H(11)	-	-	-	-	7,86	7,86	7,35	t
N(2)-H	12,89	12,89	-	Slargo	12,89	12,89	12,89	Slargo
N(4)-H	11,43	13,21	-	s	11,78	13,41	-	-
N(5)-H _a	7,91	8,28	-	s	-	-	-	-
N(5)-H _b	7,91	8,21	-	s	10,18	10,06	-	-

s: singlete, t = tripleto, m= multiplete sobr= sobreposto

Tabela 3.3 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das tiossemicabazonas derivadas de 1*H*-imidazol-5-carbaldeído (DMSO- d_6).

Atribuições	ImT (1) δ (ppm)			DEPT			ImTPh(2) δ (ppm)			DEPT		
	<i>E</i>	<i>Z</i>	tiol	<i>E</i>	<i>Z</i>	tiol	<i>E</i>	<i>Z</i>	tiol	<i>E</i>	<i>Z</i>	tiol
C(1)	121,56	121,57	-	↑	↑	-	121,96	121,96	138,84	↑	↑	↑
C(2)	131,14	134,76	-	↑	↑	-	131,28	134,70	128,61	↑	↑	↑
C(3)	135,54	135,54	-	-	-	-	135,36	135,36	135,36	-	-	-
C(4)	135,47	138,18	-	↑	↑	-	137,57	136,68	135,74	↑	↑	↑
C(5)=S	177,80	177,58	-	-	-	-	175,29	175,47	172,05	-	-	-
C(6)	-	-	-	-	-	-	138,99	138,99	165,20	-	-	-
C(7)	-	-	-	-	-	-	127,99	127,99	128,70	↑	↑	↑
C(8)	-	-	-	-	-	-	124,96	124,96	125,15	↑	↑	↑
C(9)	-	-	-	-	-	-	124,73	124,73	118,80	↑	↑	↑
C(10)	-	-	-	-	-	-	124,96	124,96	125,15	↑	↑	↑
C(11)	-	-	-	-	-	-	127,99	127,99	128,70	↑	↑	↑

Para as tiossemicabazonas (3)-(8) observou-se apenas um sinal nos espectros de ^1H e ^{13}C RMN. Os valores dos deslocamentos químicos indicam a ocorrência apenas do isômero *E*.

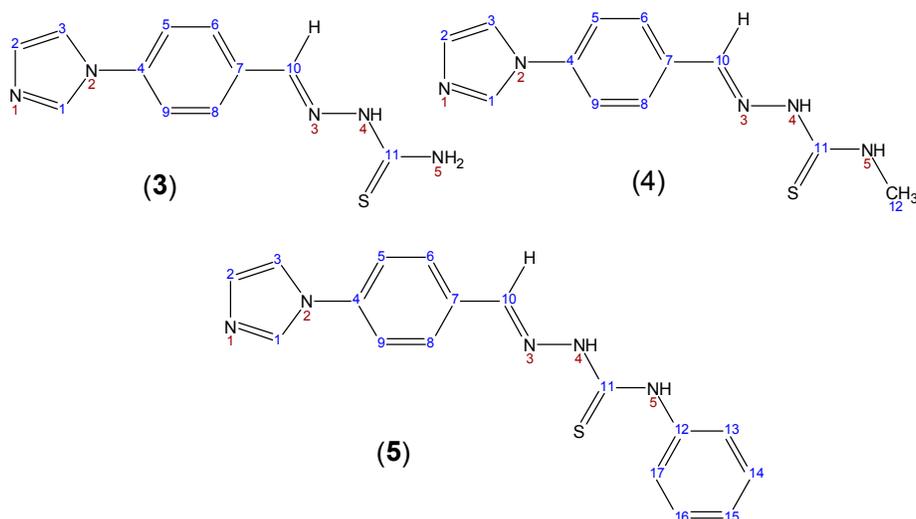


Figura 3.7 - Esquema de numeração das estruturas para atribuição dos sinais de RMN de 4ImBzT (3), 4ImBzTm (4) e 4ImBzTPh (5).

Tabela 3.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H das tiossemicabazonas derivadas de 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (DMSO-d₆).

Atribuições	4ImBzT (3) δ(ppm)	M, (J,Hz)	4ImBzTM (4) δ(ppm)	M (J,Hz)	4ImBzTPh (5) δ(ppm)	M, (J,Hz)
H(1)	8,02	s	8,07	s	8,20	s
H(2)	7,16	s	7,13	s	7,14	s
H(3)	7,85	s	7,82	s	7,84	s
H(5)	7,98	d(8,30)	7,93	d(7,52)	7,70	d(8,42)
H(6)	7,72	d(8,30)	7,70	d(8,53)	8,06	d(8,41)
H(8)	7,72	d(8,30)	7,70	d(8,53)	8,06	d(8,41)
H(9)	7,98	d(8,30)	7,93	d(7,52)	7,70	d(8,42)
H(10)	8,38	s	8,36		8,38	s
H(13)	-	-	-	-	7,58	d(7,67)
H(14)	-	-	-	-	7,38	t(7,57)
H(15)	-	-	-	-	7,21	t(7,32)
H(16)	-	-	-	-	7,38	t(7,57)
H(17)	-	-	-	-	7,58	d(7,67)
H(4)-H	11,53	s	11,57	s	11,93	s
N(5)-H _a	8,28	s	8,60	s	10,20	s
N(5)-H _b	8,14	s	-	s	-	-

s: singlete, t = tripleto, d = duplete, m= multiplete

Tabela 3.5 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C e DEPT 135 das tiossemicabazonas derivadas de 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (DMSO-d₆).

Atribuições	4ImBzT (3) δ(ppm)	DEPT	4ImBzT M (4) δ(ppm)	DEPT	4ImBzT Ph (5) δ(ppm)	DEPT
C(1)	141,15	↑	140,49	↑	141,68	↑
C(2)	129,99	↑	129,99	↑	130,01	↑
C(3)	117,79	↑	117,78	↑	117,75	↑
C(4)	137,56	-	137,49	-	137,69	↑
C(5)	120,11	↑	120,10	↑	120,04	↑
C(6)	128,74	↑	128,58	↑	129,05	↑
C(7)	132,62	-	132,69	-	132,40	-
C(8)	128,74	↑	128,58	↑	129,05	↑
C(9)	120,11	↑	120,10	↑	120,03	↑

C(10)	135,49	↑	135,49	↑	135,49	↑
C(11)=S	177,96	-	177,67	↑	176,01	-
C(12)	-	-	30,81 (-CH ₃)	↑	139,00	-
C(13)	-	-	-	-	125,97	↑
C(14)	-	-	-	-	127,99	↑
C(15)	-	-	-	-	125,34	-
C(16)	-	-	-	-	127,99	↑
C(17)	-	-	-	-	125,97	↑

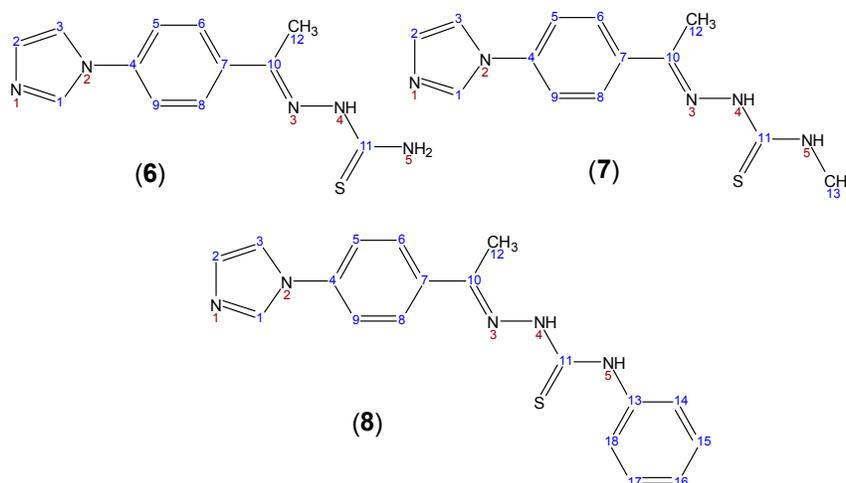


Figura 3.8 - Esquema de numeração das estruturas para atribuição dos sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas derivadas de 1-[4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil]etanona (DMSO-*d*₆).

Tabela 3.6 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas derivadas de 1-[4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil]etanona (DMSO-*d*₆).

Atribuições	4ImAcT (6)	M(<i>J</i> , Hz)	4ImAcTM (7)	M(<i>J</i> , Hz)	4ImAcTPh (8)	M(<i>J</i> , Hz)
	δ(ppm)		δ(ppm)		δ(ppm)	
H(1)	8,35	s	8,37	s	8,39	s
H(2)	7,12	s	7,13	s	7,16	s
H(3)	7,82	s	7,83	s	7,85	s
H(5)	7,66	d(8,66)	7,67(8,72)	d	7,70	d(8,60)
H(6)	8,08	d(8,67)	8,08(8,70)	d	8,18	d(8,57)
H(8)	8,08	d(8,67)	8,08(8,70)	d	8,18	d(8,57)
H(9)	7,66	d(8,66)	7,67(8,72)	d	7,70	d(8,60)

H(12)-CH ₃	2,32	s	2,32	s	2,42	s
H(13)	-	-	3,05(4,48)	d	-	-
H(14)	-	-	-	-	7,58	d(7,80)
H(15)	-	-	-	-	7,39	t(7,66)
H(16)	-	-	-	-	7,23	t(7,38)
H(17)	-	-	-	-	7,40	t(7,68)
H(18)			-		7,585	d(7,80)
H(4)-H	10,27	-	10,28	-	10,66	s
N(5)-H _a	8,33	-	8,54	-	10,15	s
N(5)-H _b	8,33	-	-		-	-

s: singlete, t = tripoleto, d = duplete, m= multipoleto

Tabela 3.7 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C e DEPT 135 das tiossemicabazonas derivadas de 1-[4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil]etanona (DMSO-*d*₆).

Atribuições	4ImAcT (6) δ(ppm)	DEPT	4ImAcTM (7) δ(ppm)	DEPT	4ImAcTPh (8) δ(ppm)	DEPT
C(1)	135,52	↑	135,50	↑	135,51	↑
C(2)	130,00	↑	129,97	↑	129,89	↑
C(3)	117,85	↑	117,82	↑	117,84	↑
C(4)	145,85	-	146,50	-	147,89	-
C(5)	119,63	↑	119,62	↑	119,64	↑
C(6)	128,15	↑	128,06	↑	128,40	↑
C(7)	137,25	-	137,18	-	137,35	-
C(8)	128,15	↑	128,06	↑	128,40	↑
C(9)	119,63	↑	119,62	↑	119,64	↑
C(10)	135,93	-	135,96	-	135,78	-
C(11)=S	178,83	-	175,56	-	176,99	-
C(12)	13,91	↑	13,91	↑	14,33	-
C(13)	-	-	31,10	↑	139,13	↑
C(14)	-	-	-	-	125,97	↑
C(15)	-	-	-	-	128,06	↑
C(16)	-	-	-	-	125,39	↑
C(17)	-	-	-	-	128,06	↑
C(18)	-	-	-	-	125,97	↑

O alargamento sinal de N(2)-H nos espectros de ^1H RMN das tiossemicarbazonas (**1**) e (**2**) indica a possibilidade de haver prototropismo no anel imidazólico (Figura 3.9). A troca rápida do próton do nitrogênio N(2) para N(3) e vice-versa provoca esse comportamento⁴.

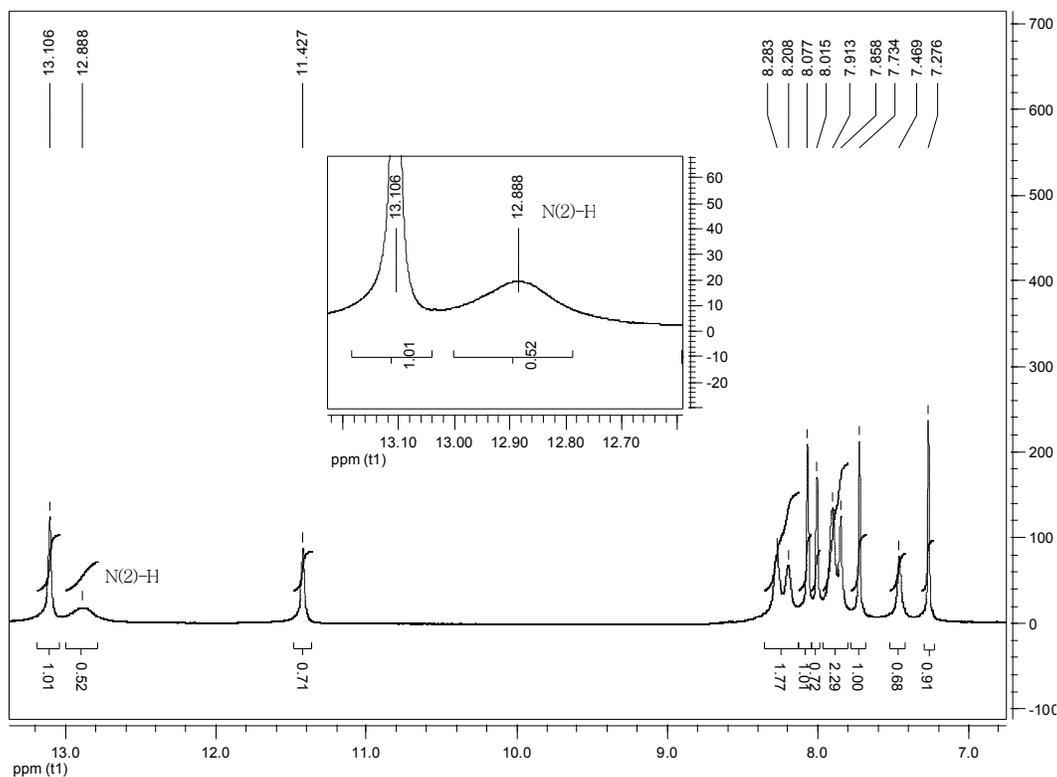


Figura 3.9 - Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) do composto (**1**) na região entre δ 14,00 - δ 6,5 ppm.

Com a troca do hidrogênio N(5)-H_b pelos grupos metila e fenila nos derivados substituídos (**4,5,7,8**), observam-se mudanças nos valores de deslocamentos químicos do hidrogênio N(5)-H_b para região mais desprotegida. Os compostos com o grupo formil em C(10) (**3-5**), os deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel imidazol e do anel benzênico são bastante similares. O mesmo ocorre entre os compostos acetil (**6-8**). Os sinais de N(4)-H na faixa entre δ 11,93–11,53 e δ 10,66–10,27 para os derivados formil e acetil respectivamente são característicos de ligação de hidrogênio com o solvente DMSO- d_6 ^{1,5}. Os sinais de N(4)-H dos derivados formil encontram-se mais desprotegidos do que aqueles dos derivados acetil, em razão do efeito gama-gauche do grupo CH₃ ligado a C(10), que dificulta a interação do DMSO

⁴ J. M. Figueiredo, C. A. Câmara, E. G. Amarante, A. L. P. Miranda, F. M. Santos, C. R. Rodrigues, C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro, *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 2243-2248.

⁵ H. Beraldo, W. Nacif, D.X. West, *Spectrochim. Acta Part A* 57 (2001) 1847–1854

com hidrogênio em N(4). Nos espectros de ^{13}C RMN de (3)-(8) os sinais dos carbonos dos anéis são muito semelhantes.

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas encontram-se na Tabela 3.8

Tabela 3.8 - Atribuição das principais bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis.

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$
ImT (1)	3446 m	1616 F	848 F
ImTPh (2)	3358 m	1635 F	841 F
4ImBzT (3)	3265 m	1601 F	830 F
4ImBzTM (4)	3145 m	1610 F	835 F
4ImBzTPh (5)	3358 m	1635 F	837 F
4ImAcT (6)	3359 m	1638 F	840 F
4ImAcTM (7)	3358 m	1615 F	830 F
4IMAcTPh (8)	3286 m	1612 F	832 F

F = forte; m=média

3.2- Análise por difração de raios-X das estruturas cristalográficas das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol

Monocristais das tiossemicarbazonas ImT (1), ImTPh (2), ImBzT (3), ImBzTM (4) e ImBzTPh (5) foram obtidos por difusão lenta em uma solução DMSO/acetona. Os dados de difração de raios-X foram coletadas em um difratômetro Oxford-Diffraction Gemini A-Ultra (LabCri) com detector CCD usando radiação $\text{K}\alpha\text{Mo}$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) em temperatura ambiente. Os refinamentos das estruturas foram feitos utilizando-se os programas SHELXS-97⁶ e SHELXL-97⁷. Os resumos da coleção de dados e do refinamento da estrutura estão dispostos na tabela 3.9. Os diagramas Ortep para as estruturas das tiossemicarbazonas (1-5) são apresentados nas Figuras 3.10 a 3.14. As distâncias e ângulos de ligação selecionados para as estruturas 1 e 2 estão dispostos na tabela 3.10 e para as estruturas 3-5 na tabela 3.10.

⁶ G.M.Sheldrick, SHELXS-97; Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.

⁷ G.M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany, 1997.

Tabela 3.9 - Resumo da coleção de dados e refinamento de ImT.H₂O (1), ImTPh (2), 4ImBzT (3), 4ImBztM (4) e 4ImBzTPh (5).

Composto	ImT.H ₂ O (1)	ImtPh (2)	4ImBzT (3)	4ImBzTM (4)	4ImBzTPh (5)
Fórmula empírica	C ₅ H ₉ N ₅ O S	C ₁₁ H ₁₁ N ₅ S	C ₁₁ H ₁₁ N ₅ S	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ S	C ₁₇ H ₁₅ N ₅ S
Massa molecular (g mol ⁻¹)	187,23	245,31	245,31	259,33	321,40
sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Dimensões do cristal (mm)	0,40x0,34x0,20	0,34x0,28x0,12	0,38x0,32x0,20	0,36x0,32x0,19	0,50x0,12x0,08
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073
Grupo espacial	P 1 2/c 1	P 1 2/c 1	P 1 2/c 1	P -1	P 21/c
Parâmetros de rede					
a (Å)	10,9469(5)	11,2820(3)	9,5673(4)	8,9483(4)	14,1315(5)
b (Å)	11,2289(4)	7,5559(2)	15,2445(4)	9,0775(3)	4,6698(2)
c (Å)	7,1883(3)	13,8018(3)	8,6535(3)	16,6341(5)	23,9591(7)
α (°)	90	90	90	91,871(3)	90
β (°)	104,813(4)	97,270(2)	112,726(4)	92,004(3)	94,220(3)
γ (°)	90	90	90	107,139(3)	90
V (Å ³)	854,23(6)	1167,09(5)	1164,12(7)	1289,06(8)	1576,80(10)
Z	4	4	4	4	4
D _{calc} (mg/m ³)	1,456	1,396	1,400	1,336	1,354
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,340	0,262	0,262	0,241	0,212
F(000)	392	512	512	544	672
Intervalo θ (°)	3,45 to 26,37	2,98 to 26,37	2,88 to 26,37	2,81 to 26,37	4,31 to 26,37
Intervalo de hkl	-8<=h<=13, -14<=k<=11, -8<=l<=8	-11<=h<=14, -9<=k<=9, -17<=l<=17	-11<=h<=11, -19<=k<=18, -10<=l<=10	-9<=h<=11, -11<=k<=11, -20<=l<=15	-17<=h<=17, -5<=k<=5, -29<=l<=27
Reflexões medidas	3944	5399	10109	11036	8929
Reflexões únicas [Rint]	1737 [0,0188]	2390[0,0186]	2375[0,0282]	5257[0,0206]	3208[0,0567]
Reflexões observadas	R1 = 0,0336, wR2 = 0,0835	R1 = 0,0341, wR2 = 0,0802	R1 = 0,0333, wR2 = 0,0939	R1 = 0,0439, wR2 = 0,1231	R1 = 0,0502, wR2 = 0,1316

[I > 2σ(I)]					
R índices (all data)	R1 = 0,0484, wR2 = 0,0876	R1 = 0,0555, wR2 = 0,0843	R1 = 0,0429, wR2 = 0,0973	R1 = 0,0708, wR2 = 0,1327	R1 = 0,0755, wR2 = 0,1405
Total de dados para (θ°)	99,9 % (26,37)	100% (26,37)	99,9 % (26,37)	99,8 % (26,37)	99,7 % (26,37)
Correção de absorção	multiscan ⁸	multiscan	multiscan	multiscan	multiscan
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²				
Dados / restrições / parâmetros	1737 / 3 / 117	2390 / 0 / 154	2375 / 0 / 155	5257 / 0 / 326	3208 / 0 / 208
S (Goodness-of-fit on F ²)	0,979	0,978	1,088	1,055	0,925
Δρ min/max (e Å ⁻³)	0,252/-0,232	0,173/-0,208	0,190/-0,270	0,251/-0,252	0,391/-0,240

ImT.H₂O (**1**), ImTPh (**2**), 4ImBzT (**3**) e 4ImBzTPh (**5**) cristalizam-se no sistema monoclinico, grupo espacial P 1 2/c 1, com uma molécula por unidade assimétrica. 4ImBzTM (**4**) cristaliza-se no sistema triclinico, grupo espacial P -1, contendo duas moléculas por unidade assimétrica.

ImT (**1**) adota configuração *EE* em relação às ligações C(3)-N(7) e C(5)-N(4), enquanto ImTPh (**2**) adota a configuração *ZE*.

⁸ CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK scaling algorithm. CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.

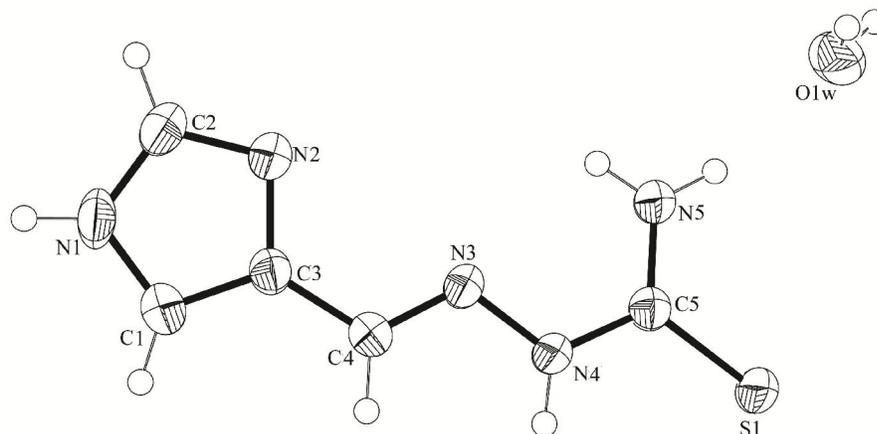


Figura 3.10 - Diagrama ORTEP de 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona com uma molécula de água na unidade assimétrica, ImT.H₂O (1).

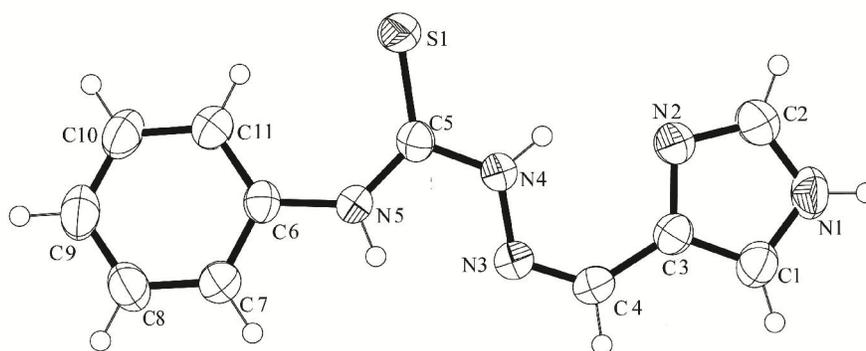


Figura 3.11 - Diagrama ORTEP de *N*(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona, ImTPh (2)

4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído, ImBzT (3) adota configuração *ZE* em relação às ligações C(10)-N(3) e C(11)-N(4) enquanto os derivados metil (4) e fenil (5) adotam a configuração *EE* (Ver Figuras 3.12 a 3.14).

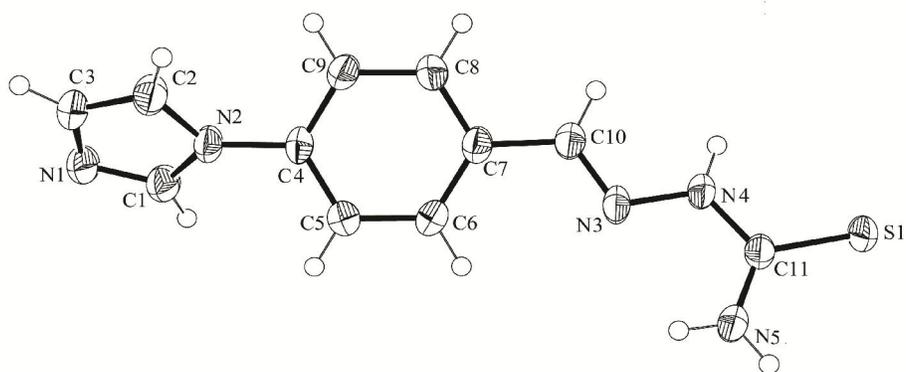


Figura 3.12 - Diagrama ORTEP de 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona 4ImBzT (3).

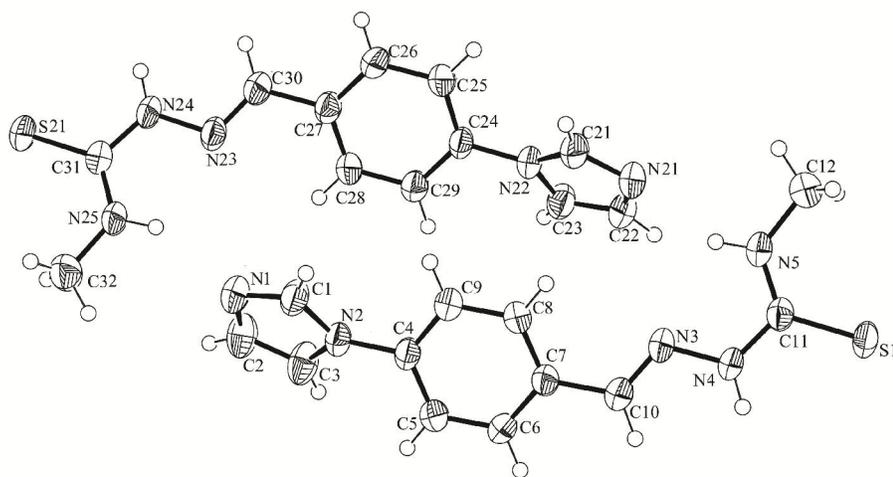


Figura 3.13 - Diagrama ORTEP de *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzTM (4).

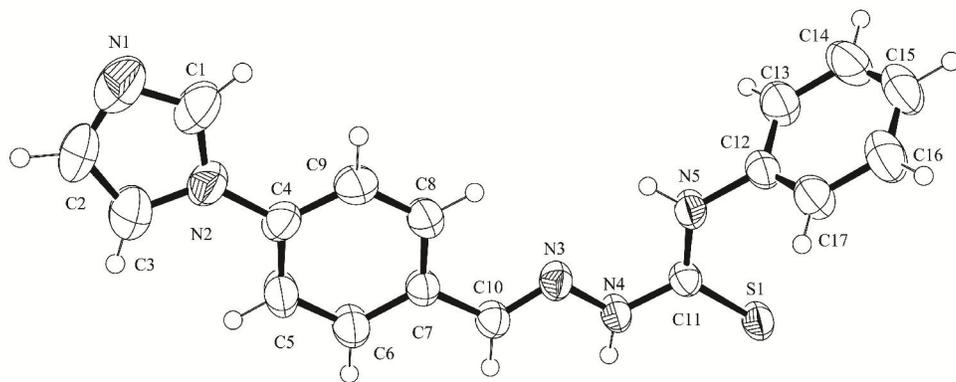


Figura 3.14 - Diagrama ORTEP de *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzTPH (5).

O esqueleto [RHNC(S)NNC] é essencialmente plano nas estruturas das moléculas **1-5** e os comprimentos de ligação são similares àqueles descritos na literatura^{9,10,11}. Nas tiosemicarbazonas derivadas de *1H*-imidazol-5-carbaldeído o comprimento das ligações é bastante similar para as duas moléculas. A maior diferença observada é no comprimento das ligações C(5)-N(5) que é de 1,317(2) Å para ImT e 1,3409(18) Å para o derivado fenilado, ImTPh (ver tabela 3.10). Os ângulos de ligação também são bastante similares entre as duas estruturas; apenas N(5)-C(5)-N(4) apresenta valores significativamente diferentes, 117,31(14)° para ImT e 113,76(13)° para ImTPh. Essa diferença pode ser explicada pela substituição de um H em N(5) por um grupo fenila.

As estruturas das tiosemicarbazonas derivadas de 4-(*1H*-imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzT (**3**), 4ImBzTM (**4**) e 4ImBzTPh (**5**) apresentam parâmetros geométricos bastante similares (Ver tabela 3.11). Os valores dos comprimentos de ligação são muito próximos, com exceção das ligações C(11)-S(1) e N(3)-N(4) que apresentam uma variação de aproximadamente 0,1 Å. Da mesma forma, os valores dos ângulos de ligação das moléculas **3-5** não apresentam diferença significativa entre si. A variação mais pronunciada ocorre no ângulo N(3)-N(4)-C(11), que é de 120,11(12)° para 4ImBzT (**1**) e 119,87(17)°, 118,83(17)° para 4ImBzTM (**4**) e 124,13(16)° para ImBzTPh (**5**).

As duas moléculas na unidade assimétrica na estrutura de 4ImTPh apresentam pequenas variações nos ângulos e distâncias de ligação muito pequenas, (ver Tabela 3.11), sendo que as maiores diferenças foram observadas na ligação C(11)-S(1) (0,0075 Å) e no ângulo N(3)-N(4)-C(11) (1,04°).

⁹ D. C. Reis, M. C. X. Pinto, E. M. Souza-Fagundes, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, H. Beraldo, *Europ. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3904-3910.

¹⁰ R. Alonso, E. Bermejo, R. Carballo, A. Castineiras, T. Pérez, *J. Mol. Struct.* 606 (2002) 155-173.

¹¹ J. S. Casas, A. Castiñeiras, M. C. Rodríguez-Argüelles, A. Sánchez, J. Sordo, A. Vázquez-López, E. Vázquez-López, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 2267–2272.

A preferência na configuração de ImT (**1**) e ImTPh (**2**) pode ser explicada pelo arranjo supramolecular (Figuras 3.13 e 3.14). Em (**1**) o nitrogênio heteroaromático do anel imidazólico está envolvido em ligação de hidrogênio intermolecular enquanto que em **2**, o nitrogênio equivalente N(2) está envolvido em uma ligação intramolecular N(2) \cdots H-(4)N.

Tabela 3.12 - Ligações de hidrogênio (\AA , $^\circ$) para 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT) (**1**) e *N*(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh) (**2**).

D-H...A	d (D-H)	d (H...A)	d (D...A)	< (DHA)
ImT (1)				
O(1W)-H(1W)...N(2)#1	0,8599(10)	2,158(10)	2,950(2)	153(2)
O(1W)-H(2W)...N(2)#2	0,8599(10)	2,200(5)	3,0487(19)	169(2)
N(1)-H(1)...S(1)#3	0,86	2,58	3,3540(15)	149,6
N(4)-H(4A)...S(1)#4	0,86	2,61	3,4168(14)	157,2
N(5)-H(5A)...O(1W)#2	0,86	2,46	3,2804(19)	161,0
N(5)-H(5B)...O(1W)	0,86	2,11	2,9428(19)	164,2
ImTPh (2)				
N(1)-H(1)...S(1)#5	0,86	2,61	3,3632(14)	147,1
N(4)-H(4)...N(2)	0,86	2,02	2,7158(18)	137,2
N(5)-H(5)...N(3)	0,86	2,12	2,5866(17)	113,9

Operações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes: #1 $-x+1,y+1/2,-z+1/2$; #2 $-x+1,-y+1,-z+1$; #3 $x,y-1,z$; #4 $-x,-y+1,-z$; #5 $-x+2,y-1/2,-z+3/2$

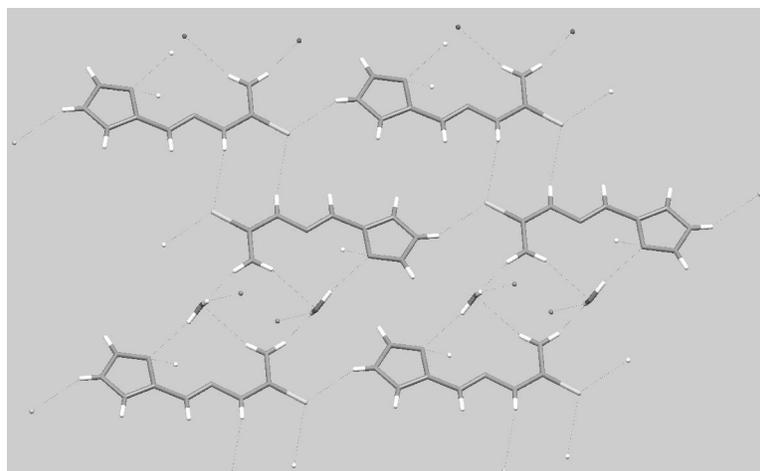


Figura 3.13- Ligações de hidrogênio para 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona, ImT (**1**).

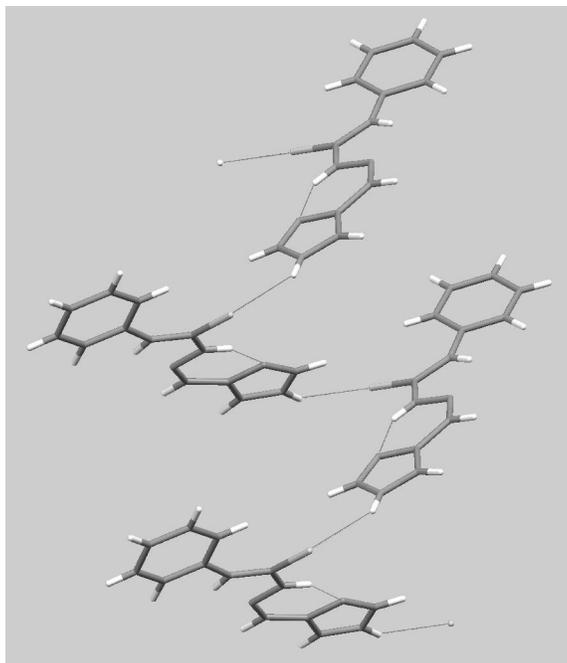


Figura 3.15 - Ligações de hidrogênio para *N*(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona, ImTPh (2).

Tabela 3.13 - Ligações de hidrogênio (Å,°) para 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT) (3), *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTM) (4), *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído (4ImBzTPh) (5)

D-H...A	d (D-H) (Å)	d (H...A) (Å)	d (D...A) (°)	< (DHA)
ImBzT (3)				
N(4)-H(4)...S(1)#1	0,86	2,60	3,4424(13)	166,4
N(5)-H(5A)...S(1)#2	0,86	2,79	3,4162(14)	130,6
N(5)-H(5B)...N(1)#3	0,86	2,12	2,9405(18)	159,4
ImBzTM (4)				
N(24)-H(24)...S(1)#4	0,86	2,56	3,3890(18)	162,7
N(25)-H(25A)...N(1)	0,86	2,22	2,999(2)	150,9
N(4)-H(4)...S(21)#5	0,86	2,55	3,3501(19)	150,9
N(5)-H(5A)...N(21)	0,86	2,21	2,984(2)	149,2
ImBzTPh (5)				
N(4)-H(4)...S(1)#6	0,86	2,56	3,3950(17)	164,0
N(5)-H(5)...N(1)#7	0,86	2,61	3,309(3)	139,1

Operações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes: #1 -x+2,-y,-z+2; #2 x,-y+1/2,z+1/2; #4 x,y,z-1; #5 x,y,z+1; #6 -x+1,-y+2,-z+1; #7 -x+2,-y,-z+1

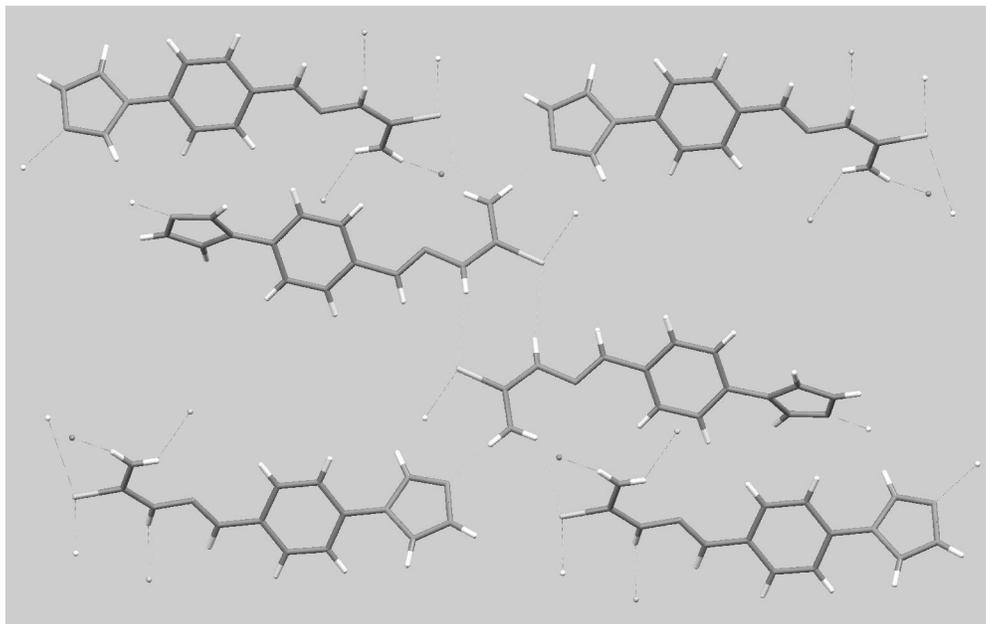


Figura 3.16- Ligações de hidrogênio para 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona, 4ImBzT (3).

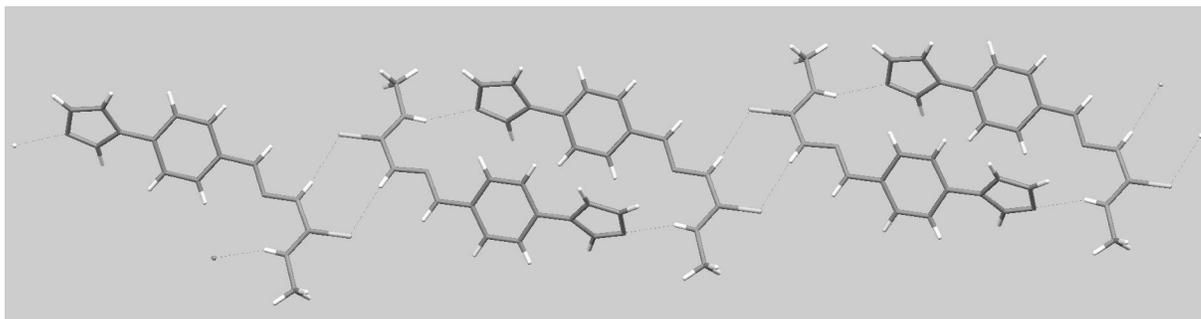


Figura 3.17 - Ligações de hidrogênio para *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído tiossemicarbazona, 4ImBzTM (4).

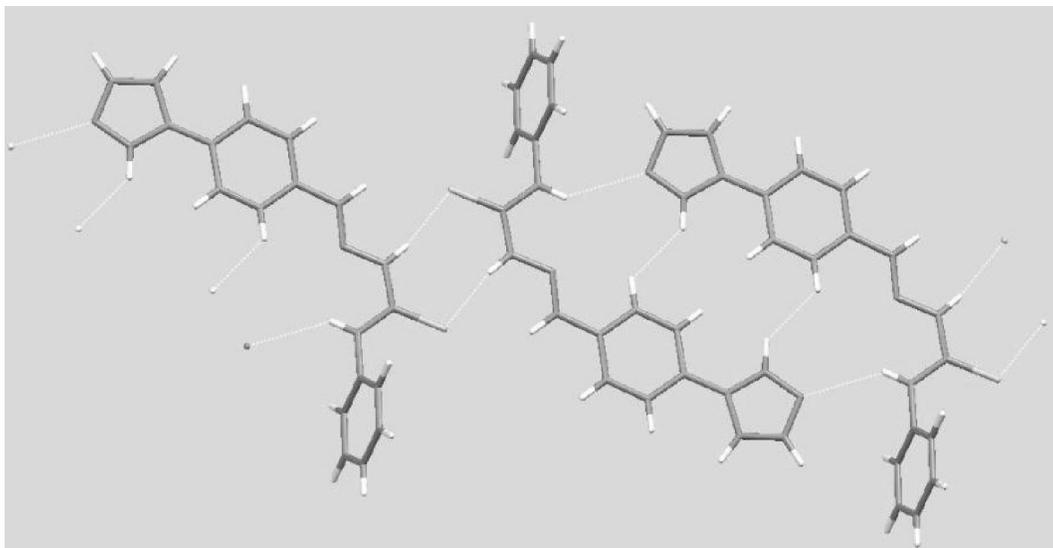


Figura 3.18 - Ligações de hidrogênio para *N*(5)-metil-4-(1*H*-imidazol-1-il)benzaldeído, 4ImBzTPh (**5**).

Em ImT (**1**) e ImTPh (**2**) o anel imidazólico apresentam ângulos de 7,24° e 2,69°, respectivamente em relação ao plano da tiosemicarbazona (ver tabela 3.14). Em ImTPh (**2**) ângulo entre o plano do grupo fenila em *N*(5) e o esqueleto tiosemicarbazona é de 13,57°.

Tabela 3.14- Ângulos entre planos de tiosemicarbazonas derivadas de 1*H*-imidazol-5-carbaldeído

Compostos	Átomos que definem o plano	Ângulo entre planos (°)
ImT (1)	(1) C2-N1-C1-C3-N2	(1) ^{^(2)} 7,24
	(2) C4-N3-N4-C5-S1	
ImTPh (2)	(1) C1-N1-C2-N2-C3	(1) ^{^(2)} 2,69
	(2) C3-N3-N4-C5-N5-S1	(2) ^{^(3)} 13,57
	(3) C7-C8-C9-C6-C11-C10	(1) ^{^(3)} 11,39

Nas tiosemicarbazonas **3** e **4** o ângulo entre os planos do anel imidazólico e o esqueleto tiosemicarbazona é de 60,83° para 4ImBzT (**3**), 53,15° e 73,51° para 4ImBzTM (**4**). Em ImBzTPh (**5**) o anel imidazólico e o esqueleto tiosemicarbazona são quase coplanares (4,74°). As diferenças entre os ângulos das duas moléculas contidas em **4** pode ser resultado das forças de empacotamento e interações supramoleculares. (Ver tabela 3.15).

Tabela 3.15- Ângulos entre planos de tiosemicarbazonas derivadas de 4-(1*H*-imidazol-1-*il*)benzaldeído

Composto	Átomos que definem o plano	Ângulo entre planos (°)
4ImBzT (3)	(1) C1-N1-C3-C2-N2	(1) ⁽²⁾ 41,24
	(2) C8-C9-C7-C5-C6-C4	(2) ⁽³⁾ 19,58
	(3) C10-N3-N4-S1-C11	(1) ⁽³⁾ 60,83
4ImBzTM (molécula 1) (4)	(1) C1-C2-C3-N1-N2	(1) ⁽²⁾ 31,71
	(2) C4-C5-C6-C7-C8-C9	(2) ⁽³⁾ 21,44
	(3) C10-N3-N4-C11-N5-S1	(1) ⁽³⁾ 53,15
4ImBzTM (molécula 2) (4)	(1) C21-C22-C23-N21-N22	(1) ⁽²⁾ 38,28
	(2) C24-C25-C26-C27-C28-C29	(2) ⁽³⁾ 37,01
	(3) C30-N23-N24-C31-N25-S21	(1) ⁽³⁾ 73,51
4ImBzTPh (5)	(1) C1-C2-C3-N1-N2	(1) ⁽²⁾ 7,49
	(2) C4-C5-C6-C7-C8-C9	(1) ⁽³⁾ 4,74
	(3) C10-N3-N4-C11-N5-S1	(1) ⁽⁴⁾ 73,64
	(4) C12-C13-C14-C15-C16-C17	(2) ⁽³⁾ 6,20
		(2) ⁽⁴⁾ 79,41
	(3) ⁽⁴⁾ 78,22	

3.3 – Avaliação da atividade antimicrobiana das tiosemicarbazonas derivadas de imidazol

Foram realizados teste quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* das tiosemicarbazonas derivadas de imidazóis (1)-(8), contra bactérias *gram*-positivas (*Salmonella typhimurium*), ATCC 6538, bactérias *gram*-negativas (*Pseudomona aeruginosa*), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 18804. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 2.4.1. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.16. Não foram determinados valores de CIM contra *C. albicans* para ImT (1) e ImTPh (2), e contra *P. aeruginosa* para 4ImBzT(3) e 4ImAcPh (8) devido a baixa solubilidade.

Tabela 3.16. Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para as tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis (1)-(8).

Composto	CIM / $\mu\text{mol L}^{-1}$	CIM / $\mu\text{mol L}^{-1}$	CIM / $\mu\text{mol L}^{-1}$
	<i>C.albicans</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ImT(1)	-	490,0	490,0
ImTPh (2)	-	510,0	510,0
4ImBzT (3)	505,0	495,0	-
4ImBzTM (4)	507,5	492,0	492,0
4ImBzTPh (5)	502,5	502,0	502,5
4ImAcT (6)	510,0	510,0	477,5
4ImAcTM (7)	505,0	500,0	475,0
4ImAcTPh (8)	492,5	495,0	-
Controles	18 ^a	3 ^b	29 ^c

(a)Fluconazol; (b)Amoxicilina; (c)Tetraciclina

Os valores de CIM sugerem que as tiossemicarbazonas obtidas não apresentam atividade significativa contra os microorganismos testados. A atividade não parece ser influenciada pela presença de substituintes no nitrogênio N(4). Igualmente a variação no substituinte em C(10) nos compostos (3)-(8) não influencia a atividade. Finalmente, a presença de um espaçador entre o grupo imidazol e a cadeia da tiossemicarbazona também não teve impacto sobre a atividade antimicrobiana.

3.3- Avaliação da atividade antifúngica das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol

Foram realizados teste quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* das tiossemicarbazonas derivadas de imidazóis (1)-(8), contra fungos filamentosos fitopatogênicos *Aspegillus flavus* (*A. flavus*) (LABB 44), *Clasdosporium clasdosporioides* (*C. clasdosproioides*) (LABB 6) e contras duas cepas de levedura *Candida albicans* (*C. albicans*) (ATCC 18804) e *Candida glabrata* (*C. glabrata*) (ATCC 2001). A determinação das concentrações inibitórias mínimas para inibir 50% do crescimento (CIM₅₀) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.4.2). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.17.

Tabela 3.17 – Valores de CIM₅₀ das tiosemicarbazonas derivadas de imidazol contra fungos fitopatogênicos e patógenos humanos.

Composto	CIM ₅₀ (μM) <i>Cladosporium cladosporioides</i>	CIM ₅₀ (μM) <i>Aspergillus flavus</i>	CIM ₅₀ (μM) <i>Candida albicans</i>	CIM ₅₀ (μM) <i>Candida glabrata</i>
ImT (1)	5,79	>1477,45	>1477,45	>1477,45
ImTPh (2)	1019,16	>1019,16	>1019,16	>1019,16
4ImBzT (3)	2,00	>1019,16	>509,58	509,58
4ImBzTM (4)	964,02	>964,02	>964,02	>964,02
4ImBzTPh (5)	777,99	>777,99	>777,99	>777,99
4ImAcT (6)	964,02	>964,02	>964,02	>964,02
4ImAcTM (7)	914,54	>914,54	>914,54	>914,54
4ImAcTPh (8)	745,33	>745,33	>745,33	>745,33
Lapachol	>515,9	>515,9	>515,9	-
Nistatina	>269	>269	>269	1,05

De modo geral os valores de CIM₅₀ sugerem que as tiosemicarbazonas testadas não apresentam uma atividade significativa contra *A. flavus* ou contra as cepas de *Candida* utilizadas para o estudo. Entretanto, os valores de CIM₅₀ das tiosemicarbazonas não substituídas ImT (1) (5,79 μM) e 4ImBzT (3) (2,00 μM) demonstraram que estes compostos exibem uma alta atividade contra *C. cladosporioides*, sendo esta atividade maior que a do composto usado como controle, nistatina (>269 μM).

Os valores de CIM₅₀ sugerem que a substituição de um hidrogênio da porção tioamida por grupo fenila ou metila, causa um decréscimo significativo na atividade dos compostos. Comparando os valores de CIM₅₀ de 4ImBzT (3) (2,00 μM) e 4ImAcT (6) (964,02 μM) podemos dizer que a troca do hidrogênio em C(10) pelo grupamento metila também interfere de forma significativa na atividade do composto.

Podemos verificar também que ImT (1) e 4ImBzT (3) apresentam atividade seletiva para o fungo *C. cladosporioides*, uma vez que os valores de CIM₅₀ para os outros fungos são muito maiores. Nenhuma das tiosemicarbazonas testadas mostra atividade significativa contra *A. flavus* ou contra as duas espécies de *Candida* testadas.

A especificidade na atividade das tiosemicarbazonas IMT (1) e 4ImBzT (3) é um ponto positivo, uma vez que a seletividade é uma propriedade muito importante em antifúngicos.

3.4 - Atividade citotóxica contra linhagens de células de leucemia humana

As tiossemicarbazonas derivadas de imidazol foram testadas quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais HL60 (leucemia promielocítica aguda) e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto). O procedimento está descrito na seção 2.4.3. Os valores de IC₅₀ são apresentados na tabela 3.18.

Tabela 3.18. Efeito das tiossemicarbazonas derivadas de imidazol no crescimento de linhagens de células leucêmicas HL60 e Jurkat (Dados em % proliferação celular a 10 µM).

Compostos	Jurkat (µM)	HL60 (µM)
ImT (1)	99,05 ± 6,62	101,59 ± 0,54
ImTPh (4)	84,03 ± 5,87	103,91 ± 6,61
4ImBzT (3)	90,08 ± 5,49	100,98 ± 10,34
4ImBzTM (4)	74,91 ± 2,08	88,04 ± 2,95
4ImBzTPh (5)	65,30 ± 3,31	103,06 ± 3,80
4ImAcT (6)	94,24 ± 8,15	93,39 ± 5,45
4ImAcTM (7)	91,27 ± 6,44	95,10 ± 0,59
4ImAcTPh (8)	89,05 ± 6,81	123,42 ± 3,65
DMSO	100,00 ± 0,00	99,99 ± 0,02
Cisplatina	41,72 ± 1,67	10,22 ± 1,35

De forma geral as tiossemicarbazonas não apresentam atividade significativa contra as linhagens de células tumorais testadas. 4ImBzTPh (4) foi a tiossemicarbazona que apresentou inibição mais próxima a da contra linhagem de célula Jurkat. No entanto a porcentagem de proliferação celular é maior que 50%.

No caso de ImT (1) e 4ImBzT (3) a baixa citotoxicidade frente às células tumorais pode ser vista como um ponto positivo, uma vez que, estes compostos apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides*. Assim, caso venham ser empregados como fármacos ou mesmo como antifúngico na produção de alimentos o risco de efeitos colaterais em humanos fica reduzido.

Capítulo 4 - Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas

I. Complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas

Neste capítulo foram obtidos complexos de bismuto(III) com 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH) e seus derivados *N*(4)metil- (H2Bz4M) e *N*(4)-fenil- (H2Bz4Ph) substituídos (Figura 4.1). Os resultados sugerem a formação de [2-benzoilpiridinatiosemicarbazona(hidroxo)(oxo)bismuto(III)] [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [*N*(4)-metil-2-benzoilpiridinatiosemicarbazona]triclorbismuto(III) [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) e [*N*(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazonato]diclorobismuto(III) [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] (3). As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.7. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 4.1), por seus espectros de infravermelho (Tabela 4.2) e ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 4.3 e 4.4).

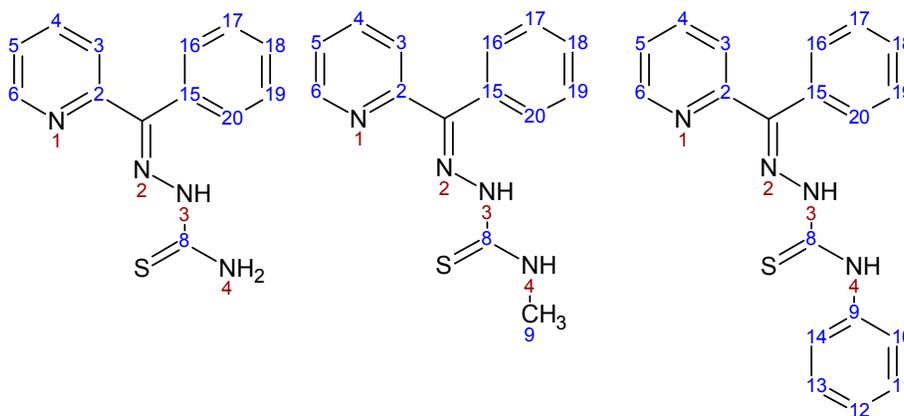


Figura 4.1.- Representação estrutural de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH) e seus derivados *N*(4)metil- (H2Bz4M) e *N*(4)-fenil- (H2Bz4Ph) substituídos.

Tabela 4.1 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.

Composto	% C	% H	%N	Fórmula Molecular	MM (g mol ⁻¹)	Λ_M^* ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
[Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1)	31,56 (31,33)	2,47 (2,63)	11,51 (11,24)	C ₁₃ H ₁₃ BiN ₄ O ₂ S	498,31	19,12
[Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2)	28,52 (28,71)	2,40 (2,41)	9,38 (9,57)	C ₁₄ H ₁₄ BiCl ₃ N ₄ S	585,69	14,76
[Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	37,56 (37,33)	2,20 (2,47)	8,27 (9,17)	C ₁₉ H ₁₅ BiCl ₂ N ₄ S	611,30	11,07

* = Λ_M ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$); 10⁻³ mol.L⁻¹ em DMF.

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) encontram-se na Tabela 4.2. A vibração atribuída a $\nu(\text{C}=\text{N})$, que encontra-se em 1585-1595 cm⁻¹ nos espectros das tiossemicarbazonas livres desloca-se para 1542-1651-cm⁻¹ nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico¹.

A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em 780-800 cm⁻¹ nos espectros das bases livres, desloca-se para 786-755 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação do enxofre. O pequeno deslocamento (4-11 cm⁻¹) no caso dos complexos (1) e (2) está de acordo com a complexação de enxofre de tiona e o deslocamento de 25 cm⁻¹ no caso de (3) está de acordo com a coordenação de um enxofre de tiolato².

No espectro infravermelho de (1) uma banda observada em 3420 cm⁻¹, ausente no espectro do ligante, foi atribuída à vibração $\nu(\text{OH})$ ³. A vibração atribuída à deformação do anel da piridina no plano, situada em 602 cm⁻¹ nos espectros de H2Bz4DH e H2Bz4M aparece em 601 cm⁻¹ no espectro do complexo (1) e em 597 cm⁻¹ no espectro de (2). Esta vibração encontra-se em 599 cm⁻¹ no espectro de H2Bz4Ph, e passa a 587 cm⁻¹ no espectro de (3). Esses resultados sugerem que em (1) e (2) a piridina não estaria envolvida na coordenação enquanto que em (3) o nitrogênio heteroaromático estaria coordenado ao metal^{4,5,6}.

¹ A. P. Rebollo, M. Vieites, D. Gambino, O. E. Piro, E. E. Castellano, C. L. Zani, E. M. S. Fagundes, L. R. Teixeira, A. A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698-706.

² A. P. Rebollo, G. M. Lima, L. N. Gambi, N. L. Speziali, D. F. Maia, C. B. Pinheiro, J. D. Ardisson, M. E Cortés, H. Beraldo, Appl. Organomet. Chem. 17 (2003) 945-951.

³ K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, second ed., Wiley-Interscience, New York, 1970.

⁴ R. F. F. Costa, A. P. Rebollo, T. Matencio, H. D. R. Calado, J. D. Ardisson, M. E. Cortés, B. L. Rodrigues, H. Beraldo, J. Coord. Chem. 58 (2005) 1307-1319.

⁵ I. C. Mendes, J. P. Moreira, N. L. Speziali, A. S. Mangrich, J. A. Takahashi, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571-1577.

⁶ A. E. Graminha, C. Rodrigues, A. A. Batista, L. R. Teixeira, E. S. Fagundes, H. Beraldo, Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 69 (2008) 1073-1076.

Novas absorções em $424-465\text{ cm}^{-1}$ e $335-404\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Bi-N})$ e $\nu(\text{Bi-S})$ respectivamente^{7,8}. Para (3) uma nova banda em 231 cm^{-1} foi atribuída à vibração $\nu(\text{Bi-N}_{\text{py}})$. No caso dos complexos (1) e (2), esta absorção não foi observada, sugerindo mais uma vez que o nitrogênio heteroaromático não estaria envolvido na coordenação³.

Tabela 4.2 - Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos $[\text{Bi}(\text{H}2\text{Bz}4\text{DH})\text{O}(\text{OH})]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}2\text{Bz}4\text{M})\text{Cl}_3]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}2\text{Bz}4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (3) - suportes: KBr ($4000-400\text{ cm}^{-1}$); CsI ($400-200\text{ cm}^{-1}$).

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MN})$	$\nu(\text{MS})$	$\nu(\text{MCl})$	$\nu(\text{MN}_{\text{py}})$
H2Bz4DH	3257F	1595F	790m	602f	-	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{H}2\text{Bz}4\text{DH})\text{O}(\text{OH})]$ (1)	3457F	1651F	786m	601f	424f	335f	-	-
H2Bz4M	3296F	1585F	800m	602f	-	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{H}2\text{Bz}4\text{M})\text{Cl}_3]$ (2)	3215F	1585F	789m	597f	465f	353f	326f 309f	-
H2Bz4Ph	3247F	1595 F	780m	599f	-	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{H}2\text{Bz}4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (3)	3247F	1542 F	755 m	587f	431f	404f	331f	231f

F= forte; m= média; f= fraca

Todos os sinais de hidrogênios e carbonos encontram-se duplicados nos espectros de RMN (DMSO-d_6) das tiossemicarbazonas livres (Tabelas 4.3 e 4.4), indicando a presença dos isômeros configuracionais *E* e *Z* na solução (ver Figura 4.1). No primeiro N(3)-H faz uma ligação de hidrogênio com o DMSO (δ 8,57-10,63) e no segundo N(3)-H faz uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio heteroaromático (δ 12,58-13,14). Este fenômeno já havia sido observado anteriormente por outros pesquisadores de nosso grupo². As proporções entre os isômeros *Z* e *E*, calculadas a partir das integrações nos espectros de ^1H RMN, foram: para H2Bz4DH, inicialmente 100% *Z* e depois de 24h 70% *Z* e 30% *E*. Para H2Bz4M e H2Bz4Ph: 70% *Z* e 30% *E* e os espectros não variam com o tempo.

⁷ G. Q. Zhong, S. R. Luan, P. Wang, Y. C. Guo, Y. R. Chen, Y. Q. Jia, J. Therm. Anal. Calorim. 86 (2006) 775–781.

⁸ J. G. Shao, Y. X. Yang, B. W. Li, L. P. Zhang, Y. R. Chen, X. L. Liu, J. Therm. Anal. Calorim. 96 (2009) 277–285.

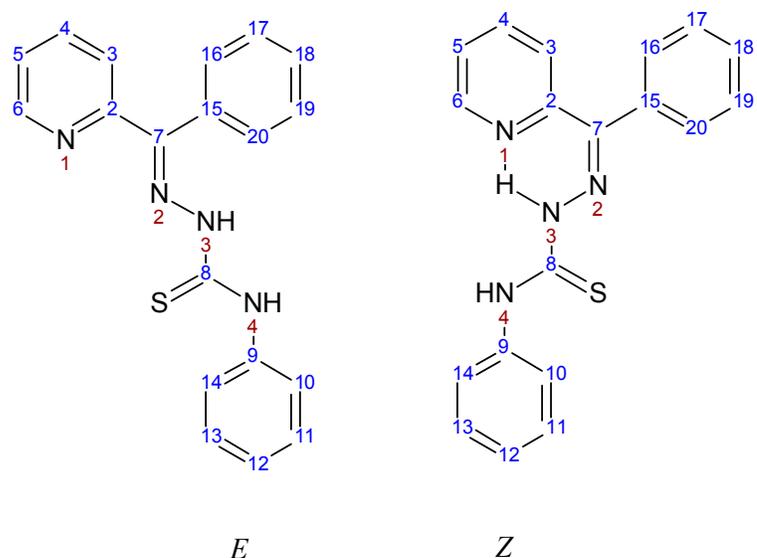


Figura 4.2- Representação dos isômeros configuracionais *E* e *Z* de H₂Bz₄Ph.

Nos complexos (1) e (2) apenas um sinal, característico do isômero *Z* foi observado para todos os hidrogênios e carbonos, indicando que a tiossemicarbazona estaria coordenada de modo bidentado, através do nitrogênio imínico e do enxofre, já que o nitrogênio da piridina estaria comprometido na ligação de hidrogênio com N(3)-H. Não foi possível observar o sinal de OH no espectro de 1. No entanto, outros autores relatam igualmente a impossibilidade de verificar a presença deste hidrogênio à temperatura ambiente, e a possibilidade de observar o sinal a baixas temperaturas⁹.

Os sinais de hidrogênio e carbono do complexo (1) encontram-se muito deslocados com relação às suas posições no ligante livre. O sinal de C=S não sofre grandes variações, de acordo com a complexação por enxofre de tiona.

Os sinais de hidrogênio e carbono não sofrem grandes variações pela coordenação no caso de (2). No entanto, o fato de que apenas um sinal foi observado para cada hidrogênio e cada carbono no espectro do complexo sugere que o ligante não se desliga do metal na solução de DMSO.

Neste ponto seria interessante comentar sobre as fórmulas estruturais dos complexos (1) e (2). Uma vez que em ambos a tiossemicarbazona se coordena de modo bidentado, haveria a possibilidade de existência de um dímero, como na Figura 4.3. Neste caso o dímero teria número de coordenação 6 no complexo (2) e 5 no complexo (1). Desse modo, o ligante, inicialmente na conformação *ZE* passaria à conformação *ZZ* para coordenar-se ao bismuto.

⁹ H. Aghabozorg, A. Nemati, Z. Derikvand, M. Ghadermazi, Acta Cryst. 374 (2008). E64 (material suplementar).

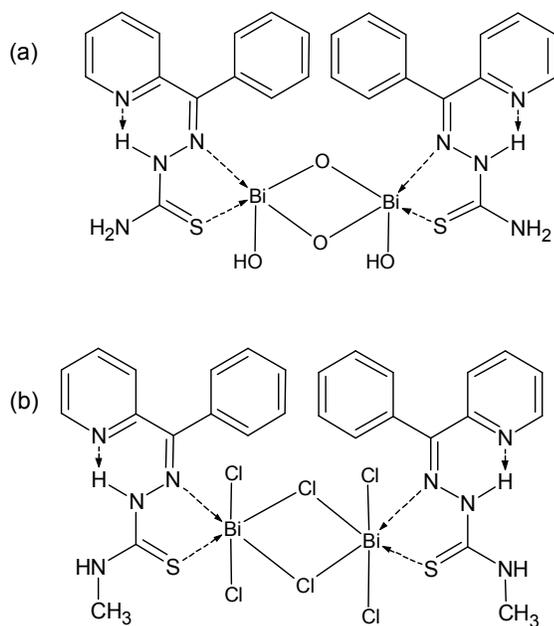


Figura 4.3 – Representação dos dímeros: (a) $[\text{Bi}(\text{H2Bz4DH})\text{O}(\text{OH})]_2$ e (b) $[\text{Bi}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3]_2$.

Tabela 4.3 – Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H de $[\text{Bi}(\text{H2Bz4DH})\text{O}(\text{OH})]_2$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3]$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), (L = ligante) (DMSO-d_6).

Atribuições	L_{DH}		(1)	M	L_{M}		(2)	M	L_{Ph}		(3)		M
	E	Z			E	Z			E	Z	E	Z	
H(3)	7,61	7,39	7,45	d	8,69	7,58	7,35	d	8,49	7,46	7,68	6,90	d
H(4)	8,07	8,02	8,01	t	7,88	7,99	8,00	t	7,87	8,00	8,06	8,06	t
H(5)	7,61	7,61	7,37	t	7,52	7,52	7,63	t	7,42	7,58	7,24	7,24	t
H(6)	8,45	8,88	8,85	d	8,43	8,84	8,87	d	8,47	8,84	9,22	9,29	d
N(3)-H	8,57	12,58	12,55	s	8,69	12,83	12,79	-	10,63	13,14	-	-	-
N(4)-H _a	8,79	8,64	8,18	lg	8,97	8,67	8,70	lg	8,96	10,27	9,53	9,79	t
N(4)-H _b	8,54	8,21	8,06	-	-	-	-	s	-	-	-	-	-
H(9)	-	-	-	-	3,07	3,07	3,05	s	-	-	-	-	-

s=simpleto; d=dupeto, t=tripeto, lg= sinal largo.

Para o complexo (**3**) foram observados dois sinais para cada hidrogênio e cada carbono, característicos dos isômeros *Z* (64%) e *E* (36%), indicando a coexistência de duas espécies na solução de DMSO. A Figura 4.4 mostra os espectros RMN de ^1H de H2Bz4Ph e de seu complexo (**3**). Os espectros não sofrem variação com o tempo. Uma vez que a maioria dos sinais de

hidrogênio e carbono encontram-se deslocados em relação às suas posições na tiossemicarbazona livre, não há descomplexação em solução. A ausência do sinal do hidrogênio em N(3) comprova que o ligante encontra-se na forma aniônica nos complexos. O grande deslocamento do sinal de C-S nos dois complexos é compatível com a passagem da forma tiona em H2BzPh para a forma tiolato nos complexos.

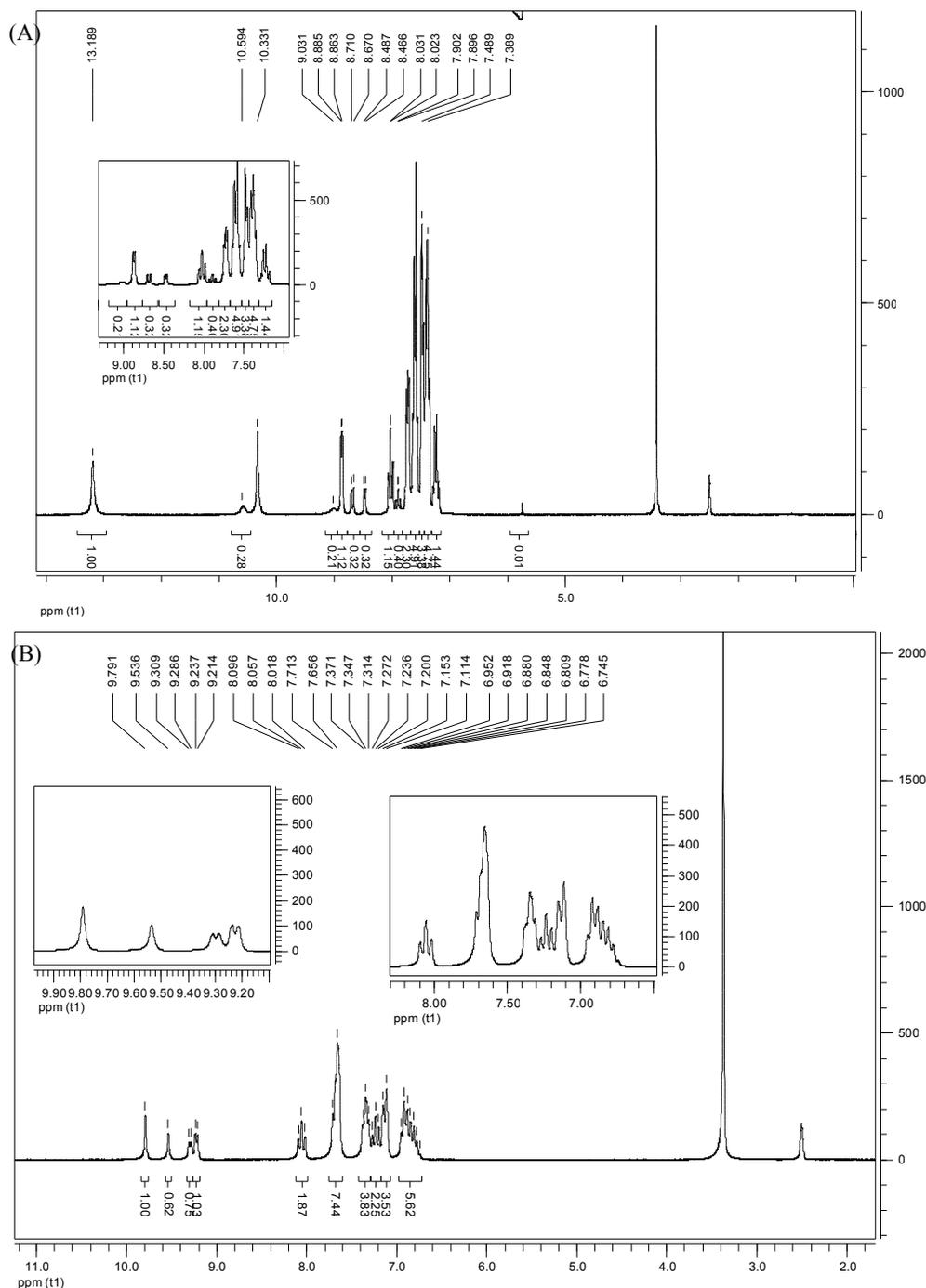


Figura 4.4 – Espectro de ¹H RMN em DMSO-d₆ de: a) H₂Bz₄Ph e b) [Bi(2Bz₄Ph)Cl₂] (3).

No complexo com o isômero *Z* o ligante só pode coordenar-se de modo bidentado, enquanto que naquele com o isômero *E* o ligante poderia coordenar-se de modo bidentado ou tridentado. Uma vez que os carbonos C(3) e C(4) da piridina, e o carbono C(15) do anel benzênico ligado a C(7) sofrem maiores variações em relação à tiossemicarbazona livre no isômero *E*, pareceria que o nitrogênio heteroarômático estaria envolvido na coordenação, ou seja, no complexo com o isômero *E* o ligante estaria coordenado de modo tridentado.

Novamente aqui a presença de espécies diméricas não pode ser descartada, tanto em solução quanto no sólido. De fato, no sólido uma mistura dos isômeros *Z* e *E* poderia estar presente, uma vez que os espectros de RMN registrados imediatamente após a dissolução não diferem daqueles registrados depois de uma semana.

Um dos capítulos deste trabalho teve como tema o estudo de complexos de bismuto(III) de *N*(4)-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazonas. Um dos compostos, o complexo com *N*(4)-*meta*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona, [Bi(2Ac4mT)Cl₂]DMF₂, já foi obtido e sua estrutura cristalográfica determinada ver Figura 6.3 (capítulo 6). Como se pode observar o composto é um dímero em que cada átomo de bismuto encontra-se hexacoordenado com uma molécula do solvente DMF como ligante, além de uma molécula da tiossemicarbazona e dois cloretos na esfera de coordenação. Dois cloretos agem como pontes ligando os centros metálicos. Uma situação semelhante poderia ocorrer no caso dos complexos estudados neste capítulo.

Tabela 4.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C de [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] (3), (L = ligante) (DMSO-*d*₆).

Atribuições	L _{DH}		(1)	L _M		(2)	L _{Ph}		(3)	
	<i>E</i>	<i>Z</i>		<i>E</i>	<i>Z</i>		<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>
C(2)	154,43	151,34	148,86	154,40	151,48	151,36	154,30	154,30	158,42	159,73
C(3)	124,01	126,09	128,30	121,58	126,05	126,04	122,48	126,34	125,31	127,89
C(4)	136,50	138,21	143,47	138,18	138,59	138,27	136,78	138,36	139,34	139,77
C(5)	121,28	124,95	126,02	124,01	124,86	124,91	125,18	125,35	126,48	125,51
C(6)	148,58	148,96	151,18	148,58	148,86	148,81	148,81	148,96	149,30	149,56
C(7)=N	137,68	143,149	138,21	131,10	142,81	142,84	149,62	144,04	150,65	149,89
C(8)=S	178,04	178,52	178,37	177,57	178,02	177,93	176,45	176,62	166,91	168,78
C(9)	-	-	-	31,26	31,42	31,24	138,87	138,87	140,93	141,02
C(15)	-	-	-	125,43	136,96	136,87	131,16	136,78	135,35	136,01

4.1- Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Com o intuito de confirmar a composição dos complexos de bismuto(III) e verificar a possibilidade de haver espécies diméricas, realizou-se o estudo através de espectrometria de massas com ionização por eletrospray. A Tabela 4.5 apresenta os dados de ESI-MS para os complexos [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] (3). As análises foram realizadas de acordo com procedimento descrito na seção 2.3. Todos os compostos foram solubilizados em MeOH:DMSO (99:1) e os espectros adquiridos no modo positivo.

Tabela 4.5- Dados de ESI-MS para os complexos [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] (3).

Composto	m/z	IR (%)	Atribuição	MS/MS (m/z)	Atribuição
(1)	719,24	100,00	[Bi(L) ₂] ⁺	497,06	[Bi(L)O(OH)] ⁺
(2)	747,49	100,00	[Bi(L) ₂] ⁺	511,06	[Bi(L)O(OH)] ⁺
(3)	871,62	100,00	[Bi(L) ₂] ⁺	573,12	[Bi(L)O(OH)] ⁺

L = representa a tiossemicarbazona na forma aniônica. IR = Intensidade relativa

As atribuições foram feitas baseadas nos valores de m/z, na distribuição isotópica dos picos e foram confirmadas por experimento de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Através da espectrometria de massas não foi possível verificar a presença de nenhum pico m/z que fosse atribuído aos complexos propostos. Porém, todos os espectros apresentam um pico m/z correspondente a espécie [Bi(L)₂]⁺ (Figura 4.5), que seria a espécie a mais estável, uma vez que ao bismuto(III) estariam coordenados dois ligantes de forma aniônica pelo sistema N_{py}-N-S.

Em todos os espectros não foram observados fragmentos com abundância relativa maior que 10%, o que corrobora com a proposta de que nas condições de análise os complexos sejam convertidos a [Bi(L)₂]⁺.

A fragmentação do pico majoritário gerou um fragmento atribuído a espécie [Bi(L)O(OH)]⁺, em que haveria a oxidação do bismuto(III) a bismuto(V).

A aplicação da técnica é de grande valia na caracterização dos complexos em virtude dos valores de m/z. Entretanto, é importante ter em mente que as atribuições feitas para as espécies em fase gasosa, não necessariamente correspondem às espécies presentes em solução ou no estado sólido¹⁰.

10 G. G. Briand, N. Buford, M. D. Eelman, N. Aumeerlly, L. Chen, T. S. Cameron, K. N. Robertson, Inorg. Chem. 43 (2004) 6495-6500.

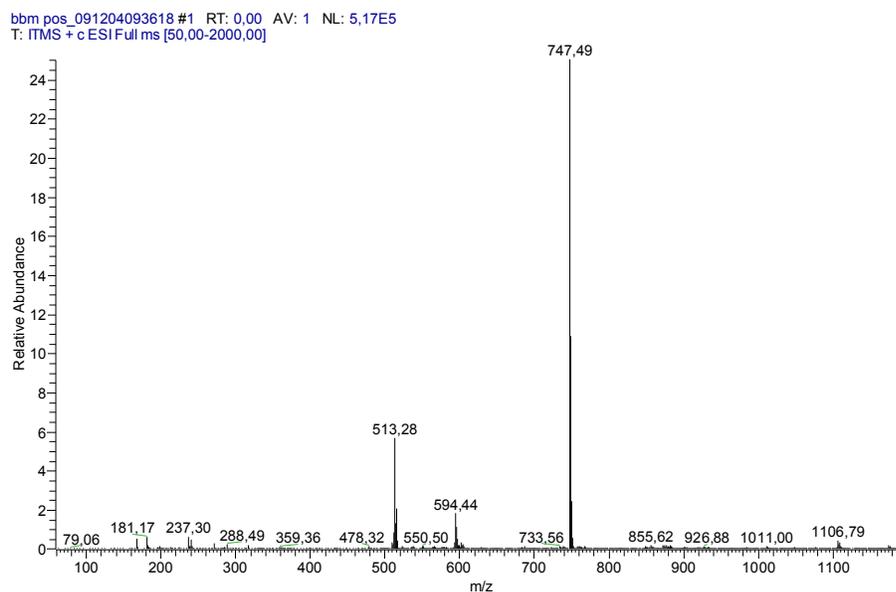


Figura 4.5 – Espectro de massas de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{M})\text{Cl}_3]$ (2) no modo positivo.

4.2 – Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas:

4.2.1- Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizados teste quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* das tiossemicarbazonas H2Bz4H, H2Bz4M e H2Bz4Ph e seus complexos de bismuto, $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{DH})\text{O}(\text{OH})]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{M})\text{Cl}_3]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (3) contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), ATCC 6538, bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 10231. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.4.1). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.6. O sal de bismuto (BiCl_3) não foi testado devido à sua baixa solubilidade. Tetraciclina e fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 4.6 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para as 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Bi(III).

Composto	CIM (μM) <i>S. aureus</i>	CIM (μM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (μM) <i>C. albicans</i>
H2Bz4DH	149,54	>2301,75	41,86
H2Bz4M	73,72	>961,71	476,23
H2Bz4Ph	51,71	>782,17	6,05
[Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1)	58,66	214,46	26,09
[Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2)	10,12	60,82	14,47
[Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	8,56	567,77	18,03
BiCl ₃	-	-	-
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Os valores de CIM sugerem que os compostos testados apresentam atividade antibacteriana mais significativa contra *S. aureus*. No teste contra *S. aureus* a coordenação ao bismuto fez aumentar de seis a sete vezes a atividade nos complexos (2) e (3) com relação às tiossemicarbazonas livres. O aumento na atividade com a complexação também é observado no complexo (1). No entanto esse aumento é mais discreto, 2,5 vezes. Uma provável causa é a natureza do composto formado. Diferente de 2 e 3, o complexo [Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1), não contém átomos de cloro.

No caso da bactéria gram-negativa (*P. aeruginosa*) a complexação promove uma melhora significativa na atividade dos complexos em relação às tiossemicarbazonas livres. A CIM do complexo [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) é de 60,82 μM , 15 vezes menor que a do seu ligante H2Bz4M. Ainda que os valores de CIM dos compostos testados sejam relativamente altos, a CIM de 2 é menor do que aquela do fármaco de referência (tetraciclina) que é de 169,20 μM .

Entre as tiossemicarbazonas a mais ativa contra *Candida albicans* foi H2BzPh. A coordenação ao bismuto(III) aumentou a atividade antifúngica dos compostos, exceto para H2BzPh.

O complexo [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) mostra um aumento de 33 vezes da atividade com relação H2Bz4M. A coordenação ao bismuto(III) da tiossemicarbazona não substituída (H2Bz4DH) levou a um aumento na atividade, porém não tão significativo quanto no caso do derivado *N*(4)-metil substituído. Todos os compostos testados, exceto H2Bz4M foram mais ativos que o fármaco de referência, fluconazol.

4.2.2- Atividade citotóxica contra células de leucemia humana

As 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) foram testadas quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60.Bcl-X_L, HL-60.Bcl2 (HL-60 ectopicamente expressando proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L e Bcl2, respectivamente), HL-60.BcrAbl (HL-60 ectopicamente expressando a tirosina quinase Bcr.abl) e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Os resultados da avaliação da atividade contra linhagens de célula da família HL-60, expressos em porcentagem de proliferação celular comparados com o controle (células tratadas com meio de cultura, DMSO 0,1%) são apresentados na Figura 4.6. Na ocasião em que os testes de *screening* estavam sendo realizados, o complexo [Bi(H₂Bz₄DH)O(OH)] (**1**) não havia sido completamente caracterizado. Por esta razão foram feitos apenas testes de determinar o valor de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular) para o composto (**1**). A cisplatina e o etoposídeo, fármacos de referência usados na clínica, foram utilizados como controle positivo.

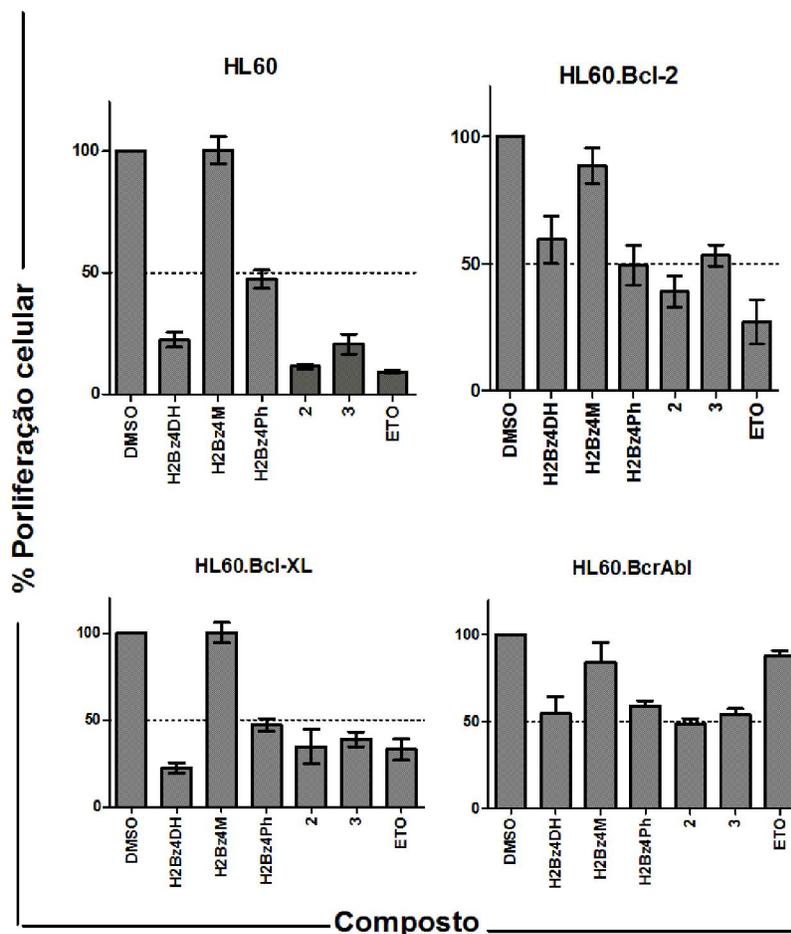


Figura 4.6 - Efeito citotóxico das 2-benzoilpiridina tiosemicarbazonas e seus complexos (2) e (3) (10 μ M) em células de leucemia humana HL-60, e em células HL-60 com expressão ectópica de BcrAbl, Bcl-2 e Bcl-X_L. Dados expressos como média \pm desvio padrão de porcentagem de proliferação em comparação ao controle. Dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Observa-se que as linhagens de célula HL-60 e HL-60.Bcl-X_L são mais sensíveis aos compostos estudados, que são capazes de inibir 50% ou mais da proliferação celular na concentração de 10 μ M. Foram determinados valores de IC₅₀ para linhagem de células HL-60 e Jurkat. Os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 4.7 mostram que as células HL-60 são mais suscetíveis às tiosemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) que as células Jurkat, com exceção de H2Bz4DH, que mostra maior citotoxicidade em células Jurkat.

Tabela 4.7. Efeito citotóxico de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4Ph e de seus complexos de bismuto(III) (1-3) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.

Compostos	HL-60 IC ₅₀ (µM)	Jurkat IC ₅₀ (µM)
H2Bz4DH	7,01 ± 0,71	2,61 ± 0,99
H2Bz4M	> 100	> 100
H2Bz4Ph	0,22 ± 0,07	8,81 ± 3,09
[Bi(H2Bz4DH)O(OH)] (1)	2,01 ± 0,39	18,36 ± 7,13
[Bi(H2Bz4M)Cl ₃] (2)	0,97 ± 0,32	> 100
[Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	4,12 ± 0,34	7,87 ± 0,60
BiCl ₃	101,32 ± 5,23	86,54 ± 7,10
DMSO	99,99 ± 0,02	100,00 ± 0,00
Cisplatina	0,83 ± 0,05	1,04 ± 0,73

Os dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Todas as tiossemicarbazonas testadas exibem um perfil de inibição de proliferação celular de forma dose-dependente tanto nas células HL-60 quanto em células Jurkat. Entre as tiossemicarbazonas, H2Bz4DH mostrou ser a mais ativa contra células Jurkat e H2Bz4Ph a mais ativa contra HL-60.

A coordenação de H2Bz4DH ao bismuto(III) resultou em um aumento de três vezes na atividade contra HL-60. O complexo [Bi(H2Bz4M)Cl₃] (2) apresenta valor de IC₅₀ cem vezes maior que o da tiossemicarbazona livre e no caso de H2Bz4Ph foi observada a diminuição da atividade com a complexação.

H2Bz4DH foi mais ativo que o complexo (1) contra células Jurkat e nos casos H2Bz4M e H2Bz4PH não se observou alteração na atividade pela coordenação ao bismuto(III).

É importante ressaltar que o valor de IC₅₀ do complexo (2) contra HL-60 é comparável ao da cisplatina que é usado como fármaco de referência e o IC₅₀ de H2BzPh é menor que o da cisplatina. Mesmo que o complexo (2) apresente atividade menor que a de uma tiossemicarbazona livre, o mecanismo de ação dos dois compostos pode ser diferente, o que tornaria a complexação uma boa estratégia para busca de fármacos com atividade antitumoral. Estudos de mecanismo de ação encontram-se em andamento.

II. Complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas

Para os complexos de antimônio(III) os resultados sugerem a formação de [(2-benzoilpiridinatiosemicarbazonato)dicloroantimônio(III)] [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**4**), [N(4)-metil-2-benzoilpiridinatiosemicarbazona]tricloroantimônio(III) dihidratado [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**) e [N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazonato)dicloroantimônio(III)] [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**).

As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.8. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 4.8) e por seus espectros de infravermelho (Tabela 4.9) e ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 4.10 e 4.11). Para o complexo (**6**) foi obtido um monocristal, através de difusão em acetona:DMSO e sua estrutura determinada por difração de raios-X (ver Figura 4.10).

No caso do complexo (**5**) a presença das duas moléculas de água de hidratação foi confirmada pela curva TG (Figura 4.7), que mostra uma perda de massa de 6,7% (teórico: 7,2%) entre 72,5 °C e 149,6 °C. Uma banda larga centrada em 3300 cm⁻¹ no espectro do complexo e ausente no da tiossemicarbazona livre sugere a presença de águas de cristalização.

Tabela 4.8 – Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.

Composto	% C	% H	% N	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	A _M (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂] (4)	35,23 (34,85)	2,37 (2,47)	12,58 (12,51)	C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ SSb	447,98	15,60
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃].2H ₂ O (5)	31,23 (31,46)	3,16 (3,39)	10,50 (10,98)	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₃ N ₄ O ₂ SSb	534,50	30,62
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	43,92 (43,54)	2,87 (2,88)	10,82 (10,69)	C ₁₉ H ₁₅ Cl ₂ N ₄ SSb	524,08	58,03

* = A_M (Ω⁻¹cm² mol⁻¹); 10⁻³ mol.L⁻¹ em DMF.

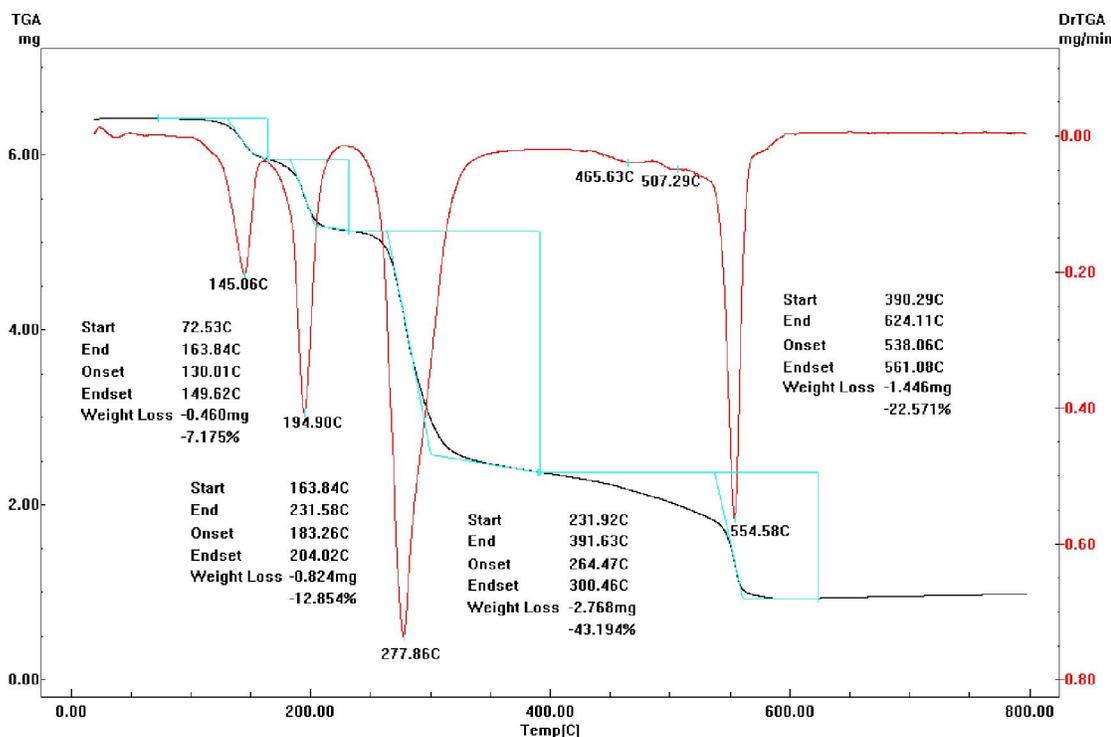


Figura 4.7- Curva termogravimétrica para o complexo $[\text{Sb}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{M})\text{Cl}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**5**).

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) encontram-se na Tabela 4.9. A vibração atribuída a $\nu(\text{C}=\text{N})$, que encontra-se em $1585\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das tiossemicarbazonas livres desloca-se para $1534\text{-}11598\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico^{1,2,4,5}.

A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em $780\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das bases livres, desloca-se para $742\text{-}780\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação do enxofre^{1,2}. O menor deslocamento (20 cm^{-1}) no espectro de (**5**) está de acordo com a complexação de enxofre de tiona⁵.

A vibração atribuída à deformação do anel da piridina no plano, situada em 607 cm^{-1} e 595 cm^{-1} nos espectros de das tiossemicarbazonas livres desloca-se para $643\text{-}603\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos (**4-6**) sugerindo coordenação ao nitrogênio heteroaromático¹⁻⁶.

Novas absorções em $445\text{-}474\text{ cm}^{-1}$ e $421\text{-}444\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Sb-N})$ e $\nu(\text{Sb-S})$ respectivamente. As absorções observadas em $218\text{-}231\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas à vibração $\nu(\text{Bi-N}_{\text{py}})$ ¹¹. As absorções atribuídas a $\nu(\text{Sb-Cl})$ foram observadas em $356\text{-}308\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos³.

¹¹ H. D. Yin, J. Zhai, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 339–345.

Tabela 4.9 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos $[\text{Sb}(\text{2Bz4DH})\text{Cl}_2]$ (**4**), $[\text{Sb}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**) – suportes: KBr ($4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$); CsI ($400\text{-}200\text{cm}^{-1}$).

Composto	v(NH)	v(CN)	v(CS)	$\rho(\text{py})$	v(MN)	v(MS)	v(MCl)	v(MN_{py})
H2Bz4DH	3257F	1600F	790m	607f	-	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{2Bz4DH})\text{Cl}_2]$ (4)	3264F	1598F	742m	633f	445f	421f	355f 316f	231f
H2Bz4M	3296F	1585F	800m	603f	-	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5)	3295F	1590F	780m	613f	475f	444f	335f 308f	-
H2Bz4Ph	3247F	1595F	780m	595f	-	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (6)	3436m	1534F	750m	643f	474f	431m	329m 311f	218f

F= forte; m= média; f= fraca

Como já mencionamos, nos espectros de ^1H e ^{13}C RMN das tiossemicarbazonas os sinais de todos os hidrogênios e carbonos encontram-se duplicados, em razão da co-existência dos isômeros *E* e *Z*. Nos espectros dos complexos (**4-6**) a presença de apenas um sinal para cada hidrogênio e cada carbono indica a presença de um único isômero.

A ausência do sinal de N(3)-H nos espectros dos complexos (**4**) e (**6**) confirma que o ligante encontra-se na forma aniônica. No espectro de **5** observa-se o sinal de N(3)-H em $\delta 12,79$ ppm, indicando a coordenação da tiossemicarbazona na forma neutra.

Os sinais de hidrogênios e carbonos encontram-se deslocados em relação às suas posições no ligante livre.

Nos espectros de ^{13}C RMN os sinais de C=N, C=S e dos carbonos do anel da piridina sofrem deslocamentos significativos, indicando que a coordenação das tiossemicarbazonas ocorre pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}^{1,2,4,6,12}$. A Figura 4.8 apresenta o espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Sb}(\text{2Bz4Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**).

¹² A. P. Rebolledo, J. D. Ayala, G. M. Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C. L. Zani, E. M. S. Fagundes, H Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 40 (2005) 467-472.

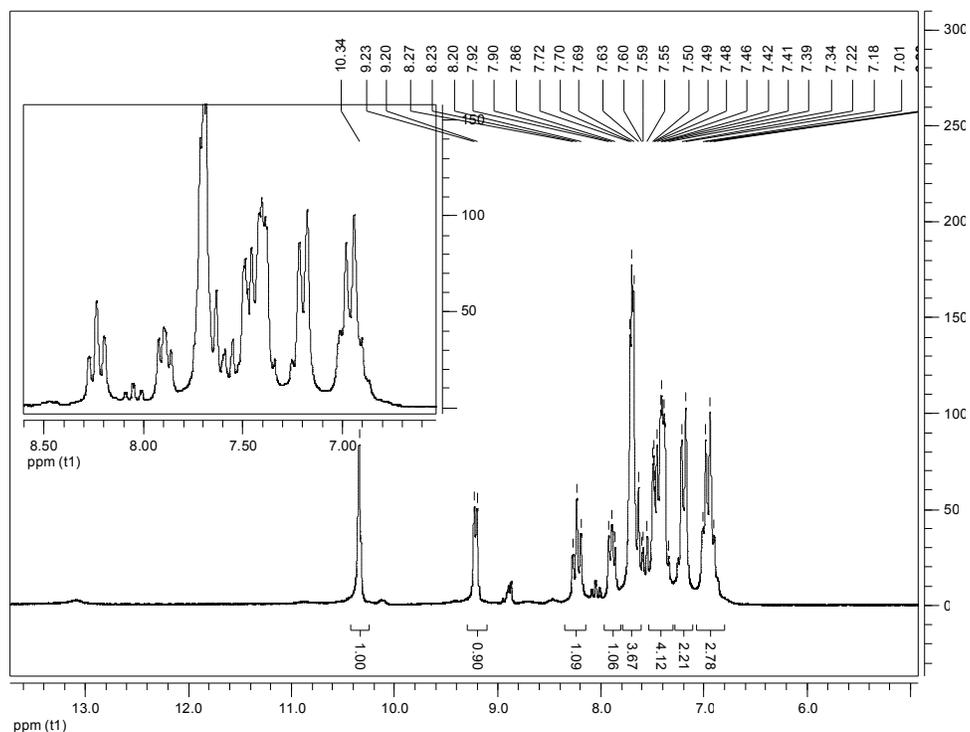


Figura 4.8 - Espectro de ¹H RMN em DMSO-d₆ do complexo [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**).

Tabela 4.10 – Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n^o) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H de [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**4**), [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**) e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{DH}		(4)	M	L _M		(5)	M	L _{Ph}		(6)	M
	E	Z			E	Z			E	Z		
H(3)	7,61	7,39	7,36	d	8,69	7,58	7,35	d	8,49	7,46	7,40	d
H(4)	8,07	8,02	8,17	t	7,88	7,99	8,21	t	7,87	8,00	8,24	t
H(5)	7,61	7,61	7,59	t	7,52	7,52	7,84	t	7,42	7,58	7,89	t
H(6)	8,45	8,88	9,12	d	8,43	8,84	9,13	d	8,47	8,84	9,23	d
N(3)-H	8,57	12,58	-	s	8,69	12,83	12,79	-	10,63	13,14	-	-
N(4)-H _a	8,79	8,64	8,03	lg	8,97	8,67	8,40	lg	8,96	10,27	10,35	s
N(4)-H _b	8,54	8,21	7,99	lg	-	-	-	s	-	-	-	-
H(9)	-	-	-	-	3,07	3,07	2,61	s	-	-	-	-

s=simpleto; d=dupleto, t=tripleto, lg= sinal largo.

Tabela 4.11 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C de [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**4**), [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**) e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{DH}		(4)	L _M		(5)	L _{Ph}		(6)
	<i>E</i>	<i>Z</i>		<i>E</i>	<i>Z</i>		<i>E</i>	<i>Z</i>	
C(2)	154,43	151,34	153,11	154,40	151,48	141,65	154,30	154,30	151,44
C(3)	124,01	126,09	124,91	121,58	126,05	122,54	122,48	126,34	127,594
C(4)	136,50	138,21	141,21	138,18	138,59	141,80	136,78	138,36	141,92
C(5)	121,28	124,95	124,57	124,01	124,86	127,78	125,18	125,35	126,83
C(6)	148,58	148,96	143,57	148,58	148,86	144,85	148,81	148,96	145,29
C(7)=N	137,68	143,149	146,18	131,10	142,81	148,82	149,62	144,04	145,04
C(8)=S	178,04	178,52	173,18	177,57	178,02	162,68	176,45	176,62	167,43
C(9)	-	-	-	31,26	31,42	30,62	138,84	-	139,52
C(15)	-	-	-	125,43	136,96	141,65	131,16	136,78	132,76

4.3-Análise por difração de raios-X da estrutura cristalográfica de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**)

Os dados para o complexo (**6**) foram obtidos à temperatura de 120 K com radiação Mo-K α , utilizando-se um difratômetro Enraf Nonius KappaCCD com detector de área da Universidade de Southampton, UK. Os dados foram coletados com o programa COLLECT¹³ e refinados com os programas COLLECT¹³ e DENZO¹⁴. A correção de absorção foi feita usando o método de comparação de intensidade das reflexões equivalentes, utilizando o programa SADABS¹⁵. O programa ORTEP-3 para Windows¹⁶ foi utilizado para obtenção das Figuras 4.10 e 4.11 e o cálculo da geometria da molécula foi feito utilizando os programas SHELXL-97¹⁷ e PLATON¹⁸. A estrutura foi resolvida por método direto e refinada utilizando os programas SHELXL-97 e SHELXS-97^{17,19}. Os dados cristalográficos e os detalhes do refinamento da estrutura estão descritos na Tabela 4.12. A estrutura cristalográfica do ligante H2Bz4Ph já foi determinada por membros da nossa equipe e os dados foram usados para comparação²⁰.

¹³ R. W. W. Hoof, COLLECT. Nonius BV, Delft, The Netherlands. 1998.

¹⁴ C. W. Carter Jr., R. M. Sweet (Eds.), Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography Part A, 307-326, Academic Press, New York, 1997.

¹⁵ G. M. Sheldrick, SADABS. Version 2.10. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA., 2003.

¹⁶ L. J. Farrugia, J. Appl. Cryst. 32 (1999) 837-838.

¹⁷ G. M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structure Refinement. University of Göttingen, Germany, 1997.

¹⁸ A. L. Spek, J. Appl. Cryst. 36 (2003) 7.

¹⁹ G. M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for the Solution of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany, 1997.

²⁰ H. Beraldo, A. M. Barreto, A. P. Rebolledo, R. P. Vieira, N. L. Speziali, C. B. Pinheiro, G. Chapuis, J. Molec. Struct. 645 (2003) 213-220.

Tabela 4.12 - Dados cristalográficos e refinamento da estrutura de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (6)

Composto	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)
Fórmula empírica	C ₁₉ H ₁₅ Cl ₂ N ₄ SSb
Massa molecular (g mol ⁻¹)	524,06
Temperatura (K)	120(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P21/c
a (Å)	7,8608(2)
b (Å)	22,6092(9)
c (Å)	11,6130(5)
α (°)	90
β (°)	93,948(2)
δ (°)	90
V (Å ³)	2059,04(13)
Z	4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,691
Coefficiente de absorção, μ (mm ⁻¹)	1,712
F(000)	1032
Dimensões do cristal (mm)	0,70 x 0,10 x 0,10
Intervalo de θ (°)	3,16-27,52
Intervalo hkl	-9 ≤ h ≤ 10 -29 ≤ k ≤ 29 -15 ≤ l ≤ 15
Reflexões medidas/únicas/ R _{int}	26591/4701/0,0580
Reflexões observadas (I > 2σ (I))	3575
Total de dados em θ=27,48	99,3%
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/restrições/parâmetros	4701 / 0 / 247
S (Goodness-of-fit on F ²)	1,067
R (abs/all)	0,0404/0,0623
wR (abs/all)	0,0969/0,1096
Δρ min/Max (e Å ⁻³)	-1,116/0,984

No complexo a tiossemicarbazona encontra-se coordenada ao íon metálico na forma aniônica tridentada em uma estrutura monomérica pentacoordenada, com dois íons cloreto monodentados completando a esfera de coordenação (Figura 4.10).

O íon antimônio(III) se encontra no plano equatorial formado pelos átomos N(1)-N(2)-S(1) e o par de elétrons não ligantes do metal. A geometria ao redor do antimônio pode ser descrita como “pseudo” octaédrica com os átomos de cloro ocupando as posições axiais. O ângulo da ligação Cl(2)-Sb(1)-Cl(1) é de 158.55(4)°. Distorções do arranjo octaédrico ideal aparecem também nos ângulos das ligações N-Sb-N e N-Sb-S, que são um pouco menores que 80° (ver Tabela 4.11) e estão de acordo com dados da literatura²¹.

O fragmento da molécula que corresponde ao sistema quelante [C(8),C(7),C(2),N(1),N(2),N(3),S(1)] e o átomo de Sb é essencialmente plano, quase ortogonal ao grupo fenila ligado a C(7) [C(15)-C(20)] {83,46(0,11)}° e faz um ângulo de 20,38(0,18)° com o grupo fenila ligado a N(4) [C(9)-C(14)].

Detalhes das ligações de hidrogênio estão listados na Tabela 4.15. Ligações de hidrogênio N(4)-H(4)...Cl(1)ⁱ relacionadas por simetria resultam na formação de cadeias [operação de simetria: i: 1+x,y,z] (ver Figura 4.6). Interações intermoleculares mais fracas C(4)-H(4)...Cl(2)ⁱⁱ, C(5)-H(5)...Cl(2)ⁱⁱⁱ e C(19)-H(19)...Cl(1)^{iv} contribuem para a formação de um arranjo tridimensional. Além disso, a análise através do programa Platon¹⁸ indicou a presença de uma variedade de interações π --- π e CH--- π .

O aumento no comprimento da ligação C(8)-S(1) de 1,663(2) Å no ligante livre para 1,725(4) Å em (6) é compatível com a mudança da forma tiona (C=S) para a forma tiolato (C-S). Além disso, há um encurtamento da ligação N(3)-C(8), que passa de 1,360(2) Å na base livre para 1,311(5) Å no complexo, pois com a desprotonação esta ligação passa a ter um caráter de dupla no complexo. Outro ponto interessante é o aumento do comprimento da ligação N(2)-N(3), que na base livre é de 1,326(2) Å e que no complexo (6) é 1,368(4) Å. Isso acontece porque na tiossemicarbazona livre a ligação exibe um leve caráter de dupla devido à ressonância do sistema N(2)-N(3)-C(8)-S(1); já no complexo o par de elétrons de N(2) está comprometido com a ligação ao metal, impedindo a ressonância, o que confere um caráter de ligação simples a N(2)-N(3) em (6) (ver Tabela 4.13).

²¹ N. C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176–1186.

Tabela 4.13 – Principais distâncias (Å), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas nas estruturas de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**) e do ligante H2Bz4Ph.

Átomos	Distâncias (Å)	
	H2Bz4Ph	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂]
Sb(1)-N(2)	-	2,252(3)
Sb(1)-N(1)	-	2,308(3)
Sb(1)-Cl(1)	-	2,6114(12)
Sb(1)-Cl(2)	-	2,5286(12)
Sb(1)-S(1)	-	2,5733(10)
N(1)-C(2)	1,343(2)	1,341(6)
N(1)-C(6)	1,335(3)	1,330(6)
S(1)-C(8)	1,663(2)	1,725(4)
N(3)-C(8)	1,360(2)	1,311(5)
N(2)-C(7)	1,296(2)	1,301(5)
N(2)-N(3)	1,326(2)	1,368(4)

Tabela 4.14- Principais ângulos (°), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observado nas estruturas de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**) e do ligante H2Bz4Ph.

Átomos	Ângulos (°)	
	H2Bz4Ph	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)
N(2)-Sb(1)-N(1)	-	70,31(12)
N(1)-Sb(1)-Cl(2)	-	79,56(9)
N(1)-Sb(1)-S(1)	-	144,82(10)
N(2)-Sb(1)-Cl(1)	-	83,08(8)
Cl(2)-Sb(1)-Cl(1)	-	158,55(4)
N(2)-Sb(1)-Cl(2)	-	83,26(9)
N(2)-Sb(1)-S(1)	-	74,51(8)
Cl(2)-Sb(1)-S(1)	-	96,34(4)
N(1)-Sb(1)-Cl(1)	-	80,30(9)
S(1)-Sb(1)-Cl(1)	-	95,86(4)
N(1)-C(2)-C(7)	118,10(16)	115,3(3)
C(2)-C(7)-N(2)	127,5(2)	117,4(4)
C(7)-N(2)-N(3)	119,4(2)	115,4(3)
N(2)-N(3)-C(8)	120,5(2)	116,0(3)
N(3)-C(8)-S(1)	117,7(1)	126,1(3)
S(1)-C(8)-N(4)	124,8(2)	115,6(3)

N(3)-C(8)-N(4)	114,3(2)	118,2(3)
C(8)-N(4)-C(9)	130,4(2)	130,2(4)

Tabela 4.15- Ligações de hidrogênio (Å), observadas na estrutura de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (6)

[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D-H...A)	(D-H...A)
N(4)-HN(4)---Cl(1) [1+x,y,z]		0,86(4)	2,66(4)	3,489(3)	162(4)
C(4)-H(4)...Cl(2) [-x,1-y,1-z]		0,95	2,78	3,610(6)	147
C(5)-H(5)...Cl(2) [-1+x,y,z]		0,95	2,52	3,402(5)	154
C(19)-H(19)...Cl(1) [x,1/2-y,1/2+z]		0,95	2,80	3,701(7)	159

Operações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes estão entre colchetes

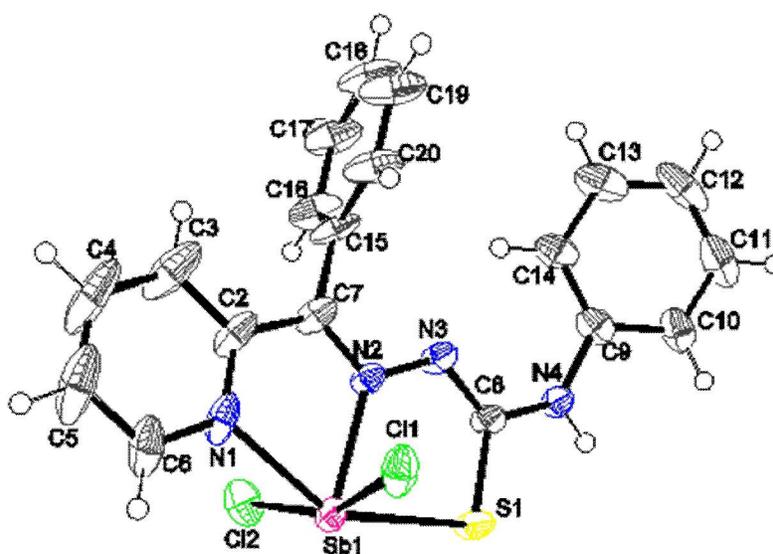


Figura 4.9 - Diagrama ORTEP e numeração para [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (6).

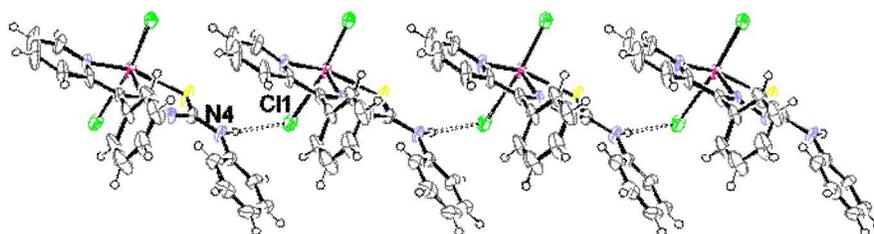


Figura 4.10. Visão do empacotamento na estrutura cristalográfica de (6) apresentando as ligações de hidrogênio N(4)-H(4)...Cl(1)ⁱ como linhas tracejadas.[operação de simetria: i: 1+x,y,z].

4.4 – Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de 2-benzolpiridina tiossemicarbazonas

4.4.1 – Avaliação da atividade antimicrobiana

Como para os complexos de bismuto(III), foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* das tiossemicarbazonas H2Bz4H, H2Bz4M e H2Bz4Ph e seus complexos de antimônio, [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**4**), [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**) e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**) contra bactérias *gram*-positivas (*Staphylococcus aureus*), ATCC 6538, bactérias *gram*-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 10231. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.16. O sal de antimônio (SbCl₃) foi testado como controle. Tetraciclina e fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 4.16. Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para de 2-benzolpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III).

Composto	CIM (μM) <i>S. aureus</i>	CIM (μM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (μM) <i>C. albicans</i>
H2Bz4DH	149,54	>2301,75	41,86
H2Bz4M	73,72	>961,71	476,23
H2Bz4Ph	51,71	>782,17	6,05
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂] (4)	75,43	287,40	48,40
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃].2H ₂ O (5)	26,12	244,62	17,70
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	505,65	992,21	18,03
SbCl ₃	2297,76	754,35	406,25
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Como observado na Tabela 4.16 os valores de CIM sugerem que os compostos testados apresentam atividade mais significativa contra *S. aureus*. No teste contra *S. aureus* a coordenação ao antimônio(III) promoveu um aumento de duas vezes na atividade de [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**4**) e de três vezes no caso de [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**), em relação aos seus respectivos ligantes. Para o complexo [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**) observou-se uma diminuição significativa (dez vezes) da atividade em relação a H2Bz4Ph. A atividade dos complexos testados é superior à do sal de partida SbCl₃.

A complexação promove uma melhora de quatro a oito vezes na atividade de (4) e (5) respectivamente contra *P. aeruginosa* em relação às tiossemicarbazonas livres. Assim como observado para bactéria *S. aureus* o complexo [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (6) mostrou-se menos ativo em comparação ao seu ligante. Um fato interessante é que o sal SbCl₃, ao contrário dos outros compostos testados, é mais ativo na bactéria *gram*-negativa.

Como já observado na seção anterior, entre as tiossemicarbazonas testadas a que exibe melhor atividade antifúngica contra *C. albicans* é H2Bz4Ph. A coordenação ao antimônio(III) aumentou em trinta vezes a atividade do ligante H2Bz4M. Os complexos [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (4) e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (6) foram menos ativos que suas respectivas tiossemicarbazonas livres. Apesar de a coordenação demonstrar ser uma boa estratégia para o aumento da atividade antifúngica de no caso de H2Bz4M, nenhum dos complexos demonstrou melhor atividade que o ligante H2Bz4Ph. Com exceção de H2Bz4M e do sal de partida SbCl₃, todos os compostos se mostraram-se mais ativos que o fluconazol.

4.4.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana

Como no caso dos complexos de bismuto(III) os complexos de antimônio (III) foram testadas quanto à atividade citotóxica frente às linhagens de células de leucemia HL-60 HL-60.Bcl-X_L, HL-60. Bcl2, HL-60.BcrAbl e Jurkat.

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Os resultados, expressos em porcentagem de proliferação celular comparados com o controle (células tratadas com meio de cultura, DMSO 0,1%) são apresentados na Figura 4.11. Cisplatina, fármaco de referência usado na clínica foi usada como controle positivo.

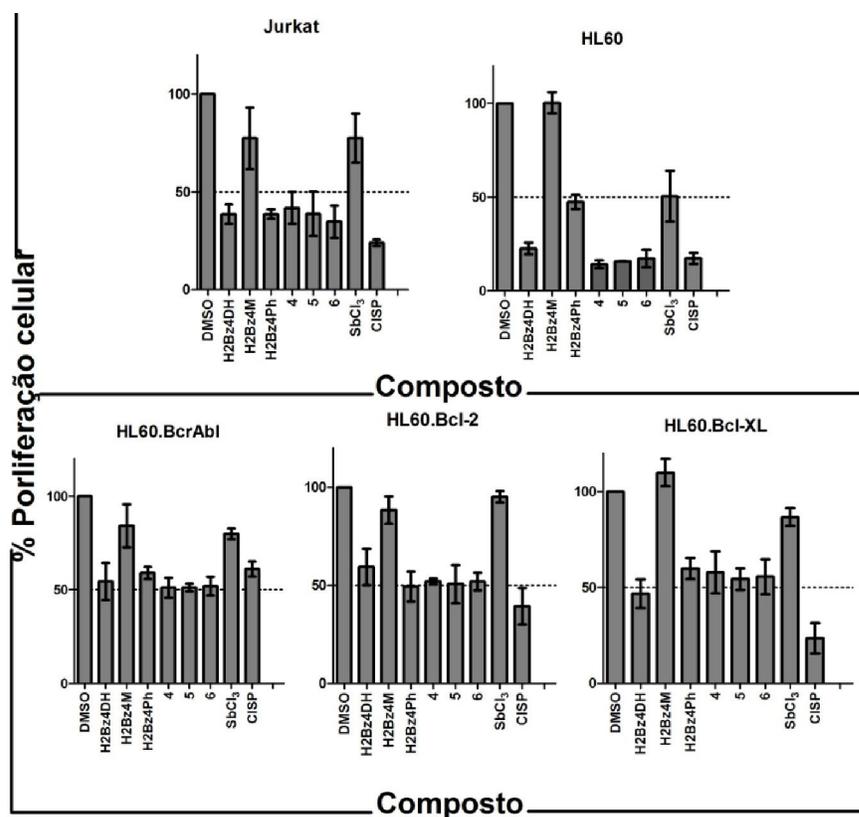


Figura 4.11 - Efeito citotóxico das tiosemicarbazonas e seus complexos (4-6) 10 μ M em células de leucemia humana Jurkat e HL-60, e em células HL-60 com expressão ectópica de BcrAbl, Bcl-2 ou Bcl-X_L. Dados expressos como média \pm desvio padrão de porcentagem de proliferação em comparação ao controle. Dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

De forma geral, observa-se que as linhagens de célula HL-60.Bcl-X_L, HL-60.Bcl2 e HL-60.BcrAbl são menos sensíveis aos compostos estudados, que são capazes de inibir 50% ou menos da proliferação celular na concentração de 10 μ M. Por isso, os valores de IC₅₀ contra essas três linhagens não foram determinados. As células HL-60 são mais suscetíveis às tiosemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) que as células Jurkat como pode ser constatado pelos valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 4.17, com exceção de H2Bz4DH, que mostra maior citotoxicidade contra células Jurkat.

As diferenças encontradas nas atividades podem ser explicadas pela diferença nos níveis de expressão de proteínas antiapoptóticas nos diferentes tipos de tumor, bem como outros fatores de mecanismo de resistência. No entanto, o estudo de tais mecanismos não foi abordado neste trabalho. Todas as tiosemicarbazonas inibem a proliferação celular de forma dose-dependente tanto nas células HL-60 quanto nas células Jurkat. Como mencionamos, dentre as

tiossemicarbazonas, H2Bz4DH mostrou ser mais ativa contra células Jurkat e H2Bz4Ph mais ativa contra HL-60.

A coordenação de H2Bz4DH ao antimônio(III) não resultou em um aumento da atividade contra células HL-60, porém a coordenação de H2Bz4M e H2Bz4Ph promoveu uma diminuição importante nos valores de IC₅₀. Os complexos [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**) e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**) apresentam efeitos citotóxicos em concentrações na ordem de nanomolar (Tabela 4.17). O sal de partida SbCl₃ é altamente ativo contra HL-60, mas exibe atividade bem menor contra células Jurkat. Desta forma, o efeito sinérgico envolvendo o metal e as tiossemicarbazonas poderia explicar, em parte, o aumento da citotoxicidade de **5** e **6** contra as células HL-60. Os complexos [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O (**5**) e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**) mostraram ser muito mais ativos do que o fármaco de controle, cisplatina, contra esta linhagem de células.

A citotoxicidade dos complexos (**2**) e (**3**) contra células Jurkat foi maior que a dos ligantes livres, mas observou-se uma diminuição na atividade com a coordenação do H2Bz4DH ao antimônio(III). O valor de IC₅₀ de **6** é inferior ao da cisplatina para essa linhagem de célula, enquanto que a atividade de **5** pode ser comparada ao do fármaco de controle.

Tabela 4.17 - Efeito citotóxico de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4Ph e de seus complexos de antimônio(III) (**4-6**) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.

Composto	HL 60 IC₅₀ (µM)	Jurkat IC₅₀ (µM)
H2Bz4DH	7,01 ± 0,71	2,61 ± 0,99
H2Bz4M	> 100	> 100
H2Bz4Ph	0,22 ± 0,06	8,81 ± 3,09
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂] (4)	8,16 ± 1,68	11,64 ± 2,31
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃].2H ₂ O (5)	0,06 ± 0,03	1,50 ± 0,19
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	0,05 ± 0,02	0,13 ± 0,03
SbCl ₃	1,84 ± 1,11	> 100
Cisplatina	0,83 ± 0,05	1,04 ± 0,73

Os dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Alguns trabalhos demonstraram que a super expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl2 e Bcl-X_L em células está diretamente relacionada ao mecanismo de resistência a fármacos. Tais proteínas regulam o potencial da membrana e o volume de homeostase de mitocôndria. Elas podem também inibir mudanças em células tratadas com estimuladores de apoptose, prevenindo assim a morte celular. A resistência é então devida à inibição da ativação da via

mitocondrial envolvida no processo apoptótico^{22,23}. Neste contexto, o resultado preliminar obtido neste trabalho suporta a hipótese de que o efeito citotóxico dos compostos estudados contra linhagem de célula HL-60 esteja associado com a indução de morte por apoptose. Além disso, o efeito reduzido da citotoxicidade dos compostos contra HL-60.Bcr-Abl também sugere que estes possuam perfil proapoptótico, uma vez que Bcr-Abl, a tirosina quinase associada a anormalidade cromossômica Filadélfia, observada na leucemia mielóide crônica, é um dos genes apoptóticos mais potentes²⁴.

Com o intuito de investigar a relação entre a inibição da proliferação celular induzida pelas 2-benzopiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio com o processo apoptótico, foi feito o teste de detecção de ADN subdiploide, um indicativo da fragmentação do ADN por apoptose. O teste foi realizado pelo método de Nicoletti modificado²⁵, conforme descrito na seção 2.4.3. Os dados são apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18- Porcentagem de fragmentação de ADN em linhagens de células de leucemia induzidas por 2-benzopiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M, H2Bz4Ph e seus complexos de antimônio(III)

Composto	HL 60	Jurkat
H2Bz4DH	45,31 ± 4,15	5,08 ± 3,69
H2Bz4M	8,06 ± 2,25	5,31 ± 2,17
H2Bz4Ph	55,85 ± 5,19	4,36 ± 2,47
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂] (4)	45,31 ± 2,63	4,95 ± 2,17
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃].2H ₂ O (5)	60,59 ± 11,44	5,05 ± 4,04
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	43,99 ± 14,22	11,64 ± 4,41
SbCl ₃	32,17 ± 3,33	3,17 ± 1,73
Cisplatina	86,05 ± 4,80	6,95 ± 0,96
DMSO	3,16 ± 1,74	2,22 ± 0,74

Células HL-60 e Jurkat foram tratadas com soluções dos compostos (10µM) por 24 horas. Os dados representam pelo menos dois experimentos independentes, feitos em duplicata.

Validando as observações já feitas neste trabalho, em concentração de 10 µM, os compostos estudados, com exceção de H2Bz4M, foram capazes de induzir entre 45-61% de fragmentação de ADN nas células HL-60, mas tiveram pouco efeito nas células Jurkat (Tabela

²² G. Brumatti, R. Weinlich, C. F. Chehab, M. Yon, G. P. Amarante-Mendes, FEBS Lett. 24 (2003) 57-63.

²³ B. Lamothe, B. B. Aggarwal, J. Interferon Cytokine Res. 22 (2002) 269-279.

²⁴ A. E. B. B. Silva, G. Brumatti, F. O. Russo, D.R. Green, G. P. A. Mendes, Cell Death Diff. 10 (2003) 592-598.

²⁵ C. Riccardi, I. Nicoletti, Nature Protocols 1 (2006) 1458-1461.

4.18). Uma vez que os compostos apresentaram efeito citotóxico contra células Jukart sem, no entanto promover fragmentação de ADN significativa, a atividade estaria ocorrendo por um mecanismo não apoptótico.

O aumento da indução de fragmentação de ADN nas células HL-60 demonstra que os compostos estudados possuem um potencial pró-apoptótico.

4.4.3- Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma Cruzi*

A Tabela 4.19 apresenta os valores de citotoxicidade e os valores de IC₅₀ de inibição do crescimento induzido pelos compostos testados contra forma tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os testes foram realizados de acordo com procedimento descrito na seção 2.4.4. Curvas dose-resposta foram obtidas para todos os compostos. No entanto em alguns casos não foi possível determinar o valor de IC₅₀.

Table 4.19. Valores de citotoxicidade e de IC₅₀ de 2-benzoipiridina tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4Ph e seus complexos de antimônio(III) contra formas tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Composto	Citotoxicidade (μ M)	IC ₅₀ tripomatigotas (μ M)	IC ₅₀ epimastigotas. (μ M)
H2Bz4DH	<3,90	12,09	ND
H2Bz4M	<3,70	ND	ND
H2Bz4Ph	<3,00	14,41	ND
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂] (4)	<2,23	1,16	1,49
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃].2H ₂ O (5)	<1,87	ND	1,36
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	<1,91	8,39	2,10
benzonidazol	96,06	6,26	6,65
ni furtimox	3,48	2,75	1,88
SbCl ₃	<4,38	65,75	6,79

ND ("Não determinado"): a curva dose-resposta foi adquirida, porém não possível fazer regressão linear dos dados.

As tiossemicarbazonas H2Bz4DH, H2Bz4M e H2Bz4PH exibem valores de citotoxicidade bastante similares. A coordenação ao antimônio(III) promoveu uma melhora na atividade em todos os casos em que foi possível determinar o IC₅₀ do complexo e de sua tiossemicarbazona correspondente. Dentre os complexos (**4**) demonstrou ser o mais ativo contra a forma tripomastigota e (**5**) foi o mais eficiente contra a forma epimastigota. Nos dois casos os

complexos são mais ativos que o fármaco de referência nifurtimox, porém apresentam citotoxicidade também superior.

O sal de antimônio SbCl_3 foi mais ativo contra a forma proliferativa epimastigota do que contra a forma tripomastigota, mas a dose necessária para inibir o crescimento da forma tripomastigota é muito alta. Como consequência a citotoxicidade do sal é a maior entre os compostos estudados nesta série.

A complexação ao antimônio demonstrou ser uma estratégia eficiente para aumentar a atividade contra *T. cruzi*. No entanto, os compostos estudados não se revelam bons candidatos a fármacos devido à sua alta citotoxicidade.

Os dados obtidos neste capítulo geraram duas publicações na forma de artigo. O trabalho intitulado “Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human leukemia cell line” foi publicado no European Journal of Medicinal Chemistry (DOI 10.1016/j.ejmech.2010.05.044) e “Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity” foi publicado na Polyhedron (10.1016/j.poly.2010.11.004). Os textos estão anexados no final da tese^{26,27}.

²⁶ D. C. Reis, M. C. X. Pinto, E. M. Souza-Fagundes, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 3904-3910.

²⁷ J. A. Lessa, D. C. Reis, I. C. Mendes, N. L. Speziali, L. F. Rocha, V. R.A. Pereira, C. M. L. Melo, H. Beraldo, Polyhedron 30 (2011) 372-380.

Capítulo 5 - Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

I. Complexos de bismuto(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona

Foram obtidos complexos de bismuto(III) com 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados *N*(4)-metil- (H2Am4M) e *N*(4)-fenil- (H2Am4Ph) substituídos (Figura 5.1). As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.9. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 5.1) e por seus espectros de infravermelho (Tabela 5.2) e ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 5.3 e 5.4).

Os resultados das análises sugerem a formação de [(dicloro-2-piridinoformamida tiossemicarbazonato)bismuto(III)], $[\text{Bi}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$ (**1**), [(*N*(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazona) (*N*(4)-metil-2-piridinoformamida tiossemicarbazonato) pentacloro dibismuto(III)], $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$ (**2**) e [(dicloro-*N*(4)-fenil-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)bismuto(III)] diidratado, $[\text{Bi}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**).

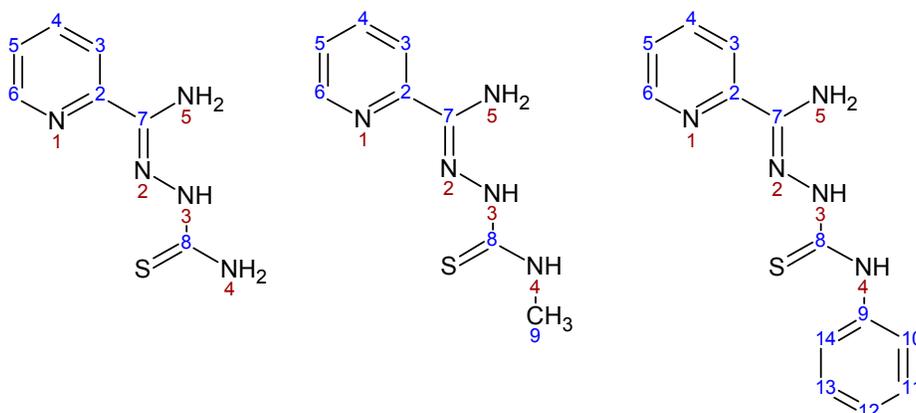


Figura 5.1 – Representação da estrutura de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados *N*(4)metil- (H2Am4M) e *N*(4)-fenil- (H2Am4Ph) substituídos.

Tabela 5.1 – Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), fórmula molecular, massa molar e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.

Composto	% C	% H	%N	Fórmula Molecular	MM (g mol^{-1})	Λ_M^* ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$)
[Bi(2Am4DH)Cl ₂] (1)	17,68 (17,73)	1,81 (1,70)	14,00 (14,77)	C ₇ H ₉ BiCl ₂ N ₅ S	474,12	8,80
[Bi ₂ (H2Am4M)(2Am4M)Cl ₅] (2)	17,38 (18,32)	1,76 (2,09)	12,76 (13,35)	C ₁₆ H ₂₁ Bi ₂ Cl ₅ N ₁₀ S ₂	1012,76	32,39
[Bi(2Am4Ph)Cl ₂].2H ₂ O (3)	26,60 (26,63)	2,33 (2,75)	11,82 (11,94)	C ₁₃ H ₁₈ BiCl ₂ N ₅ O ₂ S	586,68	10,63

* = Λ_M ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$); 10^{-3}mol.L^{-1} em DMF.

A presença de duas moléculas de água em [Bi(2Am4Ph)Cl₂].2H₂O (2) foi confirmada pela curva termogravimétrica. (Figura 5.2) que mostra uma perda de 5,8 % (teórico 6,2 %) entre 238 - 270 °C, correspondente a duas moléculas de água.

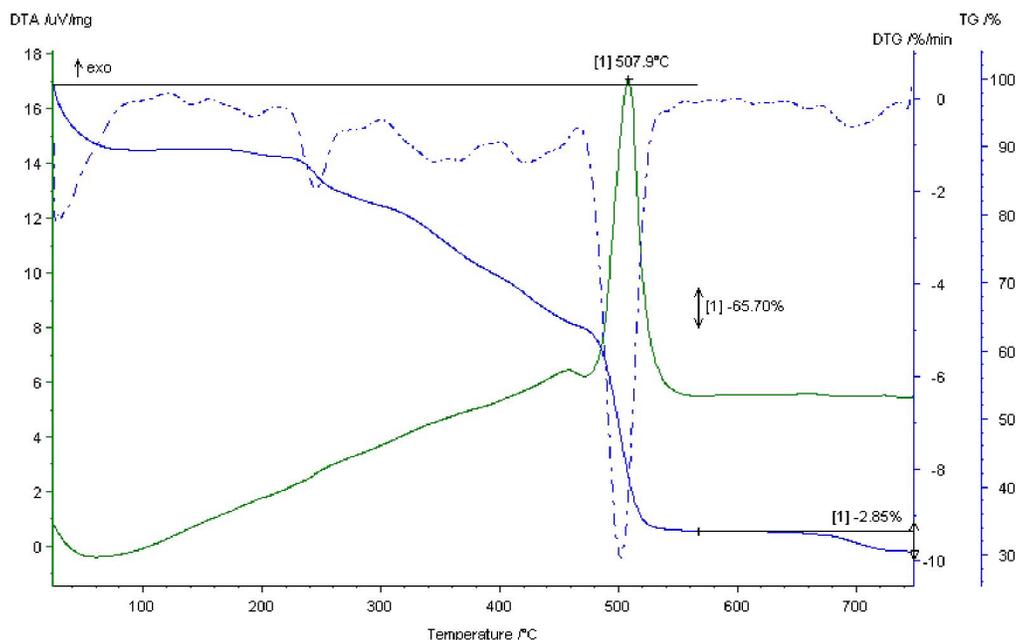


Figura 5.2 - Curva termogravimétrica para o composto [Bi(2Am4Ph)Cl₂].2H₂O (3)

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) encontram-se na Tabela 5.2. A vibração atribuída a $\nu(\text{C}=\text{N})$, que

encontra-se em 1597-1611 cm^{-1} nos espectros das tiossemicarbazonas livres desloca-se para 1592-1623 cm^{-1} nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico^{1,2}.

A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em 787 cm^{-1} e 795 cm^{-1} nos espectros de H2Am4DH e H2Am4Ph, respectivamente, desloca-se para 722 cm^{-1} e 737 cm^{-1} nos espectros dos seus os complexos **(1)** e **(3)**, sugerindo a coordenação do enxofre na forma de tiolato. No espectro de H2Am4M a vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$ se encontra em 797 cm^{-1} e no espectro do complexo $[\text{Bi}_2(\text{H}_2\text{Am}_4\text{M})(2\text{Am}_4\text{M})\text{Cl}_5]$ **(2)** podemos observar duas bandas de $\nu(\text{C}=\text{S})$, uma em 795 cm^{-1} indicando a presença de enxofre complexado na forma de tiona e outra banda em 728 cm^{-1} compatível com coordenação ao enxofre na forma de tiolato³.

A vibração atribuída à deformação do anel da piridina no plano, $\rho(\text{py})$, situada em 600-606 cm^{-1} nos espectros dos ligantes, sofre um deslocamento para 635-654 cm^{-1} nos espectros de **(1-3)**. Esses resultados sugerem que em todos os complexos a piridina estaria envolvida na coordenação⁴. Novas absorções em 416-441 cm^{-1} e 352-357 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Bi-N})$ e $\nu(\text{Bi-S})$ respectivamente. A nova banda observada em 244-246 cm^{-1} foi atribuída à vibração $\nu(\text{Bi-N}_{\text{py}})$ nos complexos **(1-3)**, sugerindo mais uma vez que o nitrogênio heteroarômático estaria envolvido na coordenação^{5,6,7}. As novas absorções em 302-303 cm^{-1} observadas nos espectros de **(1-3)** foram atribuídas a vibração $\nu(\text{Bi-Cl})$ ⁵.

Tabela 5.2 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de 2-piridinofarmamida tiossemicarbazonas e de $[\text{Bi}(2\text{Am}_4\text{DH})\text{Cl}_2]$ **(1)**, $[\text{Bi}_2(\text{H}_2\text{Am}_4\text{M})(2\text{Am}_4\text{M})\text{Cl}_5]$ **(2)** e $[\text{Bi}(2\text{Am}_4\text{Ph})\text{Cl}_3].2\text{H}_2\text{O}$ **(3)** – suportes: KBr (4000-400 cm^{-1}); CsI (400-200 cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MN})$	$\nu(\text{MS})$	$\nu(\text{MCl})$	$\nu(\text{MN}_{\text{py}})$
H2Am4DH	3421F	1611F	787m	606m	-	-	-	-
$[\text{Bi}(2\text{Am}_4\text{DH})\text{Cl}_2]$ (1)	3454f	1592m	722m	635m	416f	352m	303f	245f
H2Am4M	3367F	1606m	797f	600m	-	-	-	-
$[\text{Bi}_2(\text{H}_2\text{Am}_4\text{M})(2\text{Am}_4\text{M})\text{Cl}_5]$ (2)	3373F	1622m	795m 728m	654m	441m	357m	302f	246f
H2Am4Ph	3438F	1597m	795m	606m	-	-	-	-
$[\text{Bi}(2\text{Am}_4\text{Ph})\text{Cl}_3].2\text{H}_2\text{O}$ (3)	3617m	1599m	737m	637m	421f	357f	303f	244f

¹ I. C. Mendes, F. B. Costa, G. M. Lima, J. D. Ardisson, I. Garcia-Santos, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 1179–1185.

² K. O. Ferraz, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, S. R. W. Louro, H. Beraldo, Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. 73 (2009) 140–145.

³ I. C. Mendes, J. P. Moreira, J. D. Ardisson, R. G. Santos, P. R. O. Silva, I. G., A. Castiñeiras, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem.43 (2008) 1454-1461.

⁴ I. C. Mendes, M. A. Soares, R. G. Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870–1877.

⁵ K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 2nd ed. Wiley-Interscience, New York, 1970.

⁶ G.Q. Zhong, S.R. Luan, P.Wang, Y.C.Guo, Y.R. Chen, Y.Q. Jia, J. Therm. Anal. Calorim. 86 (2006) 775–781.

⁷ J. G. Shao, Y. X. Yang, B.W.Li, L. P. Zhang, Y. R. Chen, X. L. Liu, J. Therm. Anal. Calorim. 96 (2009) 277–285.

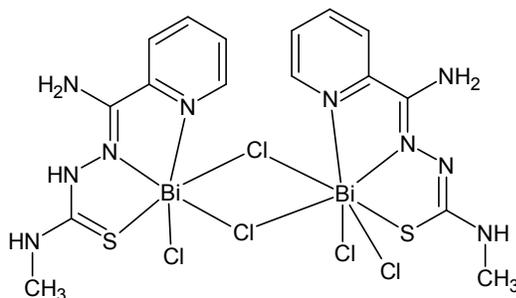
F= forte; m= média; f= fraca

Nos espectros de ^1H RMN dos complexos **(1)** e **(3)** o desaparecimento do sinal de N(3)-H indica que a tiossemicarbazona se encontra desprotonada. Pela coordenação observa-se que os sinais de hidrogênio da piridina sofrem deslocamentos em relação às suas posições no ligante livre, sendo que o que sofre maior variação é o sinal de H(6). Os carbonos da piridina, C=N e C=S sofrem grandes deslocamentos, sugerido a coordenação através do sistema quelante tridentado $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}^{1-3}$.

Para o complexo **(2)** observa-se a presença de sinais duplicados de hidrogênios e carbonos, indicando a existência de duas espécies em solução. Uma das espécies **(2a)** estaria protonada, já que apresenta o sinal de N(3)-H. A outra **(2b)** estaria desprotonada, uma vez que não mostra o sinal de N(3)-H. Nas duas espécies observa-se a mudança dos deslocamentos químicos dos sinais de ^1H e ^{13}C em relação ao ligante livre. Desta forma podemos dizer que não há descomplexação, mas sim a presença de duas espécies em solução. Os dois sinais de cada carbono e cada hidrogênio são diferentes entre si e diferentes dos sinais da tiossemicarbazona livre. Nos espectros de carbono os sinais de C-S em δ 177,63 e δ 168,29 ppm são compatíveis com a presença de um enxofre de tiona e um enxofre de tiolato respectivamente^{8,9}.

O resultado da análise elementar seria compatível com a existência seja de um complexo do tipo $[\text{Bi}(\text{HL})\text{Cl}_3]$, seja a de um dímero do tipo $[\text{Bi}_2(\text{HL})(\text{L})\text{Cl}_5]$ onde as unidades monoméricas estariam ligadas por duas pontes de cloreto (ver Figura 5.3). Para a primeira hipótese teríamos que supor a ocorrência de desprotonação de um dos ligantes na solução de DMSO. No entanto, como a integração dos hidrogênios no espectro de ^1H RMN indica a presença da relação 1:1 para as formas protonada e desprotonada, o mais provável seria que o composto estivesse no sólido sob a forma dimérica, contendo um ligante neutro e um ligante aniônico.

Neste ponto seria interessante ressaltar que a existência de complexos de bismuto (III) diméricos semelhantes ao proposto já foi reportada na literatura⁹.



⁸ R. P. Tenório, A. J. S. Góes, J. G. Lima, A. R. Faria, A. J. Alves, T. M. Aquino, Quim. Nova 28 (2005) 1030-1037.

⁹ K. Nomiya, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, N. C. Kasuga, H. Yokoyama, S. Nakano, K. Onodera, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 601-615.

Figura 5.3- Representação do dímero $[\text{Bi}_2(\text{H}_2\text{Am}_4\text{M})(2\text{Am}_4\text{M})\text{Cl}_5] (\mathbf{2})$.

A Figura 5.4 apresenta os espectros de ^1H RMN do ligante $\text{H}_2\text{Am}_4\text{M}$ e do complexo $(\mathbf{2})$. É importante observar a presença do sinal de N(3)-H em δ 10,04 ppm com integração correspondente a um hidrogênio e de dois sinais de H(9) em δ 2,91 e δ 3,03 ppm com integração correspondente a seis hidrogênios sugerindo assim a presença de dois grupos metila e somente um N(4)-H, reforçando a hipótese da presença da espécie dimérica $[\text{Bi}_2(\text{H}_2\text{Am}_4\text{M})(2\text{Am}_4\text{M})\text{Cl}_5] (\mathbf{2})$.

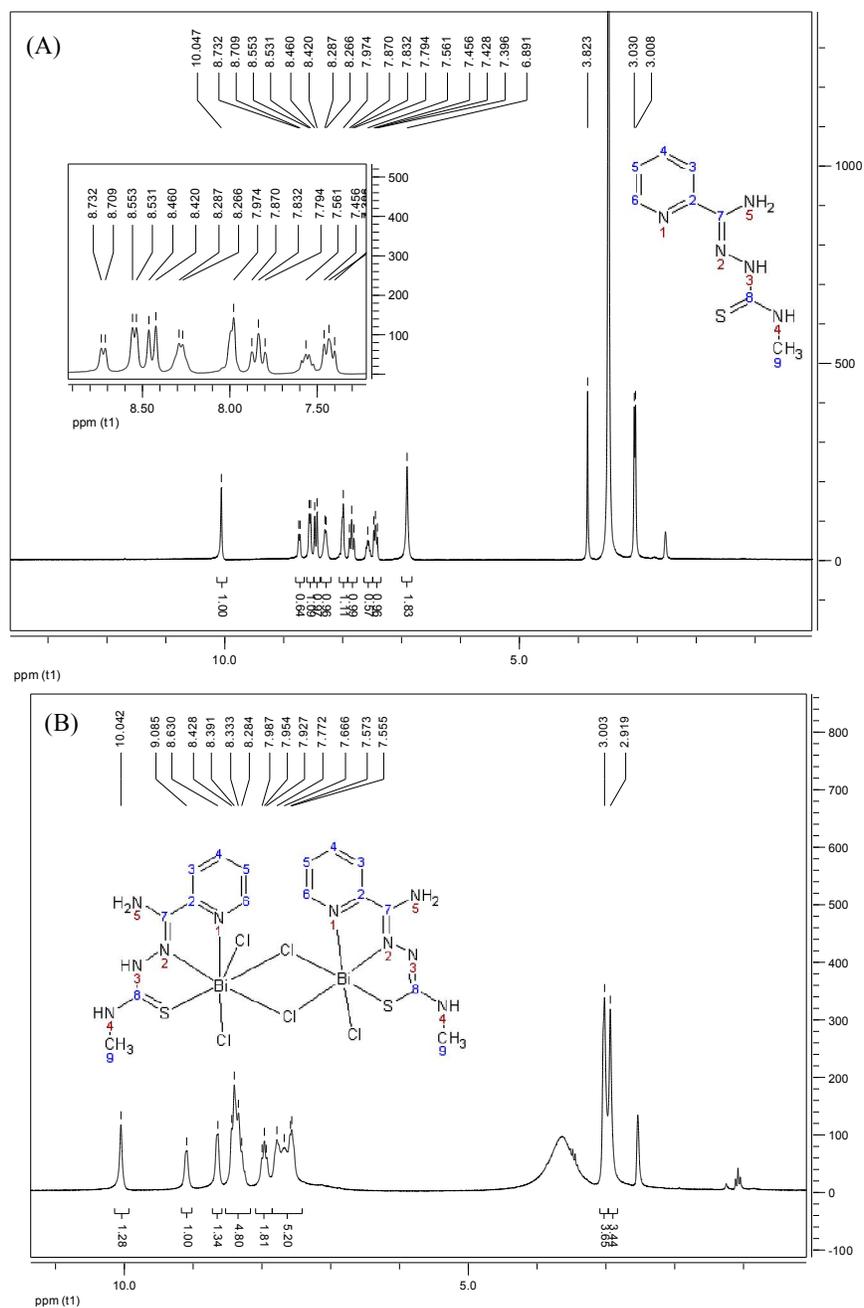


Figura 5.4 – Espectro de ¹H RMN em DMSO-d₆ de a) H₂Am₄M e b) [Bi₂(H₂Am₄M)(2Am₄M)Cl₅] (2).

Tabela 5.3 – Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H de [Bi(2AmDH)Cl₂] (1), [Bi₂(H₂Am₄M)(2Am₄M)Cl₅] (2) e [Bi(2Am₄Ph)Cl₂] (3), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{DH}	(1)	M	L _M	(2)	(2a)	M	L _{Ph}	(3)	M
H(3)	8,43	8,24	sb	8,46	7,99	8,38	-	8,60	8,36	d
H(4)	7,82	8,25	sb	7,83	7,74	8,22	-	7,85	8,28	t
H(5)	7,43	7,74	t	7,43	7,51	7,74	-	7,46	7,78	t
H(6)	8,55	9,06	d	8,55	8,59	9,06	-	8,60	9,15	d
N(3)-H	10,05	-	-	10,07	10,04	-	-	10,45	-	-
N(4)-H _a	7,92	7,55	lg	8,29	7,36	6,85	-	9,91	9,29	s
N(4)-H _b	7,78	7,55	lg	-	-	-	-	-	-	-
N(5)-H ₂	6,91	6,82	lg	6,91	sb	sb	-	7,12	sb	-
N(4)-CH ₃	-	-		3,03	3,00	2,89	-	-	-	-

d=duplete, t=tripleto, td=tripleto duplo, dd=duplete duplo, sb=sobreposto, lg= sinal largo.

Tabela 5.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C de [Bi(2AmDH)Cl₂] (1), [Bi₂(H₂Am₄M)(2Am₄M)Cl₅] (2) e [Bi(2Am₄Ph)Cl₂].2H₂O (3), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{DH}	(1)	L _M	(2)	(2a)	L _{Ph}	(3)
C(2)	141,97	145,95	141,97	146,01	145,86	149,93	145,87
C(3)	121,10	121,84	121,05	123,17	121,62	121,48	121,60
C(4)	136,66	140,28	136,59	137,78	136,97	136,75	140,01
C(5)	124,50	126,28	124,46	125,06	126,36	124,75	126,62
C(6)	147,87	148,51	147,92	148,45	149,13	147,97	148,67
C(7)=N	150,18	156,89	150,24	148,50	157,18	142,67	157,76
C(8)=S	176,72	165,50	178,99	177,63	168,29	174,73	162,22
C(9)	-	-	-	-	-	139,36	142,01
N(4)-CH ₃	-	-	30,77	30,80	32,58	-	-

5.1 - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Na Tabela 5.5 são apresentados os dados de ESI-MS para os complexos [Bi(2AmDH)Cl₂] (1), [Bi₂(H₂Am₄M)(2Am₄M)Cl₅] (2) e [Bi(2Am₄Ph)Cl₂].2H₂O (3). As análises foram realizadas de acordo com procedimento descrito na seção 2.3. Todas os compostos foram dissolvidos em MeOH:DMSO (99:1). Os espectros foram adquiridos no modo positivo.

Tabela 5.5 - Dados de ESI-MS para os complexos $[\text{Bi}(\text{2AmDH})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**)

Composto	m/z	IR (%)	Atribuição	MS/MS (m/z)	Atribuição
(1)	597,20	100,00	$[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$	436,03	$[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$
(2)	625,13	100,00	$[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$	450,09	$[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$
(3)	749,29	100,00	$[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$	512,05	$[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$

L = representa a tiossemicarbazona na forma aniônica. IR = Intensidade relativa

Como no capítulo anterior os espectros de massa não mostraram a presença de nenhum pico m/z que fosse atribuído aos complexos propostos. Porém, todos os espectros apresentam um pico m/z correspondente a espécie $[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$ como a mais abundante (Figura 5.5), que seria a espécie a mais estável, uma vez que ao bismuto(III) estariam coordenados dois ligantes de forma aniônica pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$.

A fragmentação do pico majoritário gerou um fragmento atribuído a espécie $[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$, em que haveria a oxidação do bismuto(III) a bismuto(V), como apresentado na Figura 5.6. O mesmo comportamento foi verificado nos complexos discutidos no capítulo anterior.

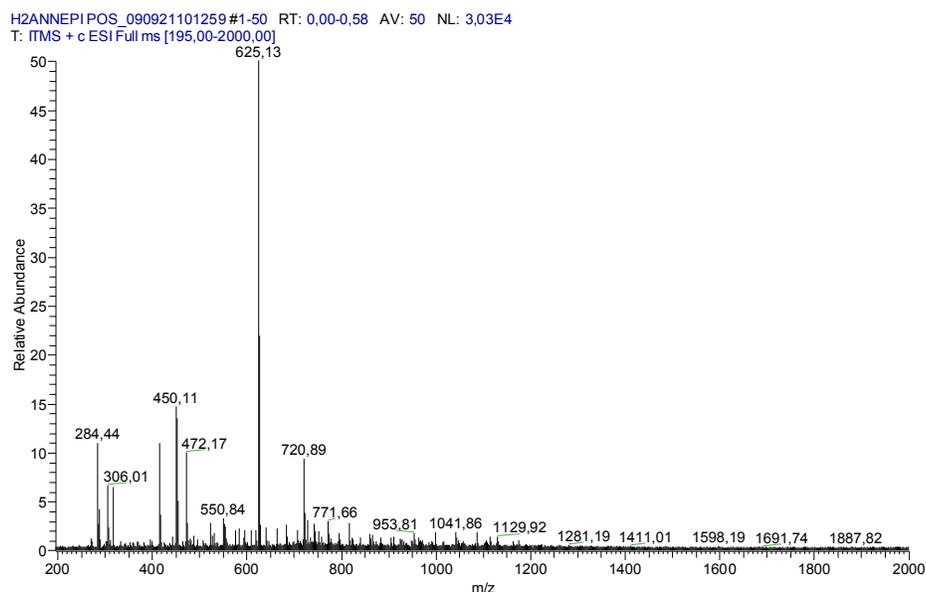


Figura 5.5 - Espectro de massas para $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$ (**2**) no modo positivo.

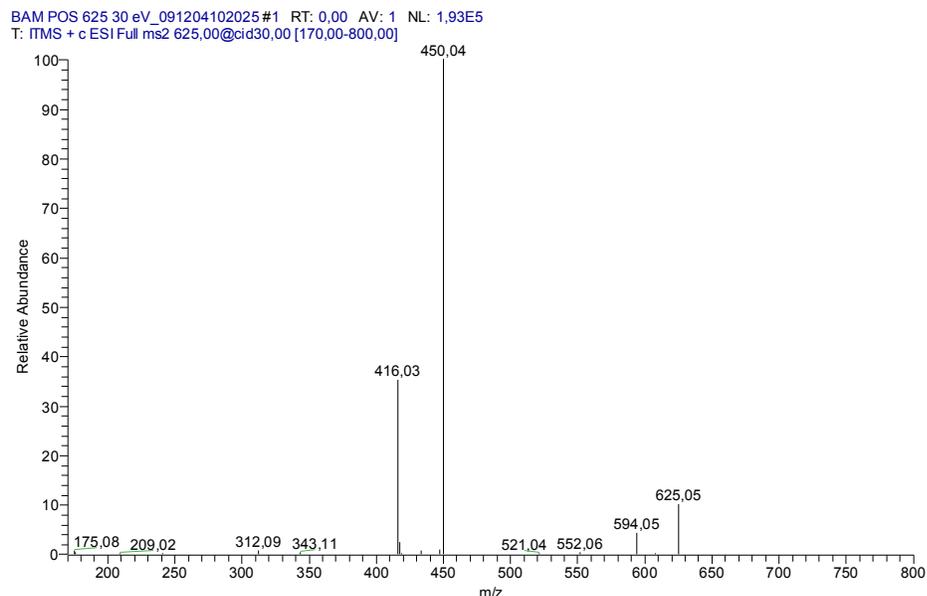


Figura 5.6 – Espectro de massas sequencial (MS/MS) do íon $m/z = 625,05$ correspondente ao pico majoritário do espectro de **(2)**, demonstrando a formação da espécie $[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$ a partir de $[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$.

5.2 – Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de 2-piridinofarmamida tiossemicarbazonas

5.2.1- Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* das tiossemicarbazonas H2Am4H, H2Am4M e H2Am4Ph e seus complexos de bismuto(III), $[\text{Bi}(\text{2AmDH})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), ATCC 6538, bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 10231. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.4.1). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.6. Como já citado nos capítulos anteriores, o sal de bismuto (BiCl_3) não foi testado devido à sua baixa solubilidade. Tetraciclina e fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 5.6 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) (1-3)

Composto	CIM (μ M) <i>S. aureus</i>	CIM (μ M) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (μ M) <i>C. albicans</i>
H2Am4DH	2411,39	>2868,26	391,61
H2Am4M	2229,99	>2675,97	527,63
H2Am4Ph	>8292,18	>1861,13	>374,30
[Bi(2AmDH)Cl ₂] (1),	29,87	117,08	89,64
[Bi ₂ (H2Am4M)(2Am4M)Cl ₅] (2)	14,39	60,41	42,59
[Bi(2Am4Ph)Cl ₂].2H ₂ O (3)	45,44	106,51	148,43
BiCl ₃	-	-	-
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Os valores de CIM sugerem que a coordenação ao bismuto(III) faz melhorar a atividade das tiossemicarbazonas contra todos os microorganismos testados.

A complexação promove melhora significativa na atividade contra *S. aureus*. [Bi(2Am4Ph)Cl₂].2H₂O (3) é 180 vezes mais ativo de que seu ligante livre. Embora o aumento na atividade dos complexos seja bastante expressivo nenhum deles exibe CIM inferior ao da tetraciclina. Da mesma forma, a atividade contra *P. aeruginosa* é muito maior para os complexos que para as bases livres. Além disso, os compostos (1-3) exibem atividade superior ao fármaco de referência.

A complexação também promoveu melhoras na atividade contra *C. albicans*. O complexo (2) é o mais ativo. No entanto podemos considerar sua atividade semelhante à de (1) já que [Bi₂(H2Am4M)(2Am4M)Cl₅] (2) possui dois ligantes na sua estrutura.

Apesar do sal BiCl₃ não ter sido testado devido a solubilidade, não se pode descartar a possibilidade de haver um efeito sinérgico entre o metal e o ligante que leva ao aumento na atividade. Finalmente, como já discutido em trabalhos anteriores a mudança da lipofilia pela coordenação também pode ser responsável pelo aumento na atividade¹.

5.2.2- Avaliação da atividade citotóxica contra células de leucemia humana

As tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e seus complexos de bismuto(III) foram testadas quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HL-60.Bcl-X_L, HL-60. Bcl2 (HL-60 ectopicamente expressando proteínas anti-apoptóticas Bcl-X_L e Bcl2, respectivamente), HL-60.BcrAbl (HL-60 ectopicamente expressando a tirosina quinase Bcr.abl) e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Os resultados da avaliação da atividade contra linhagens de célula da família HL-60, expressos em porcentagem de proliferação celular comparados com o controle (células tratadas com meio de cultura, DMSO 0,1%) são apresentados na Figura 5.7. Etoposídeo, fármaco de referência usado na clínica, foi usado como controle positivo.

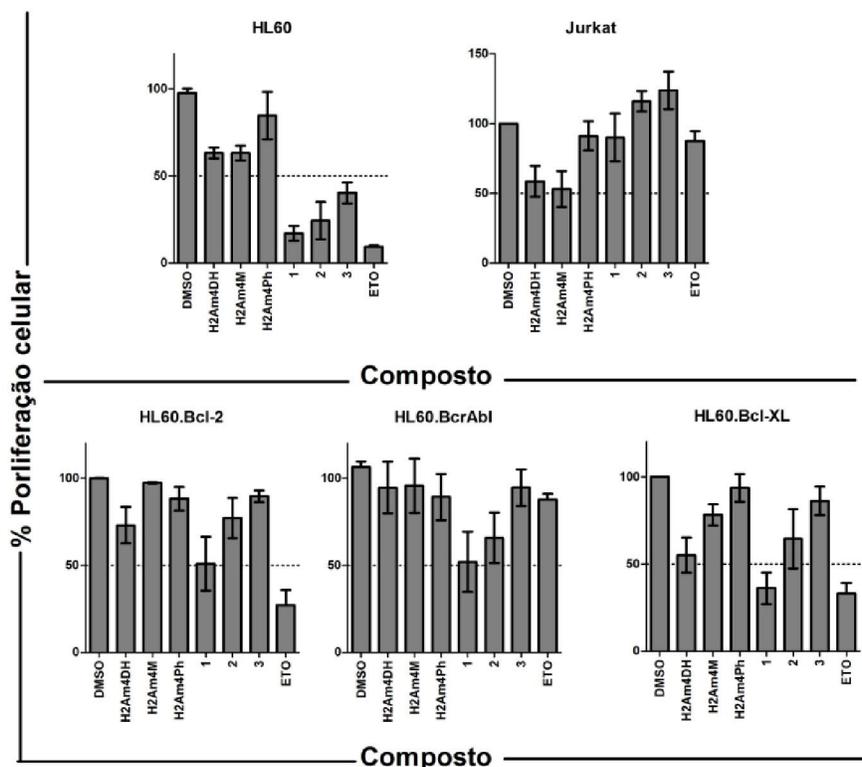


Figura 5.7 - Efeito citotóxico das 2-piridinoformamida tiosemicarbazonas e seus complexos (1-3) (10 μ M) em células de leucemia humana Jurkat, HL-60, e em células HL-60 com expressão ectópica de BcrAbl, Bcl-2 ou Bcl-X_L. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média de porcentagem de proliferação em comparação ao controle. Dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Dentre as linhagens estudadas, a HL-60 se mostrou a mais sensível aos complexos de bismuto(III) que são capazes de inibir 50% ou mais da proliferação celular na concentração de 10 μ M. Foram determinados valores de IC₅₀ para linhagem de células HL-60 e Jurkat. Os dados são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Efeito citotóxico das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de bismuto(III) (1-3) em linhagens de célula tumoral HL-60 e Jurkat.

Compostos	HL-60 IC ₅₀ (µM)	Jurkat IC ₅₀ (µM)
H2Am4DH	5,65 ± 1,63	4,35 ± 2,54
H2Am4M	8,27 ± 0,6	5,24 ± 2,54
H2Am4Ph	9,07 ± 1,02	1,28 ± 0,50
[Bi(2Am4DH)Cl ₂] (1)	11,76 ± 1,85	50,79 ± 3,24
[Bi ₂ (H2Am4M)(2Am4M)Cl ₅] (2)	3,29 ± 0,29	> 100
[Bi(2Am4Ph)Cl ₂].2H ₂ O (3)	14,2 ± 3,36	> 100
BiCl ₃	101,32 ± 5,23	86,54 ± 7,10
Cisplatina	0,83 ± 0,05	0,86 ± 0,70

Os dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Em geral as tiossemicarbazonas livres se mostraram mais ativas que seus respectivos complexos contra as duas linhagens, ou seja, a coordenação ao bismuto(III) fez diminuir consideravelmente a atividade do ligante, com exceção do complexo (2) que se revelou mais ativo que a tiossemicarbazona livre contra células HL-60. Vale observar que os complexos foram mais ativos contra HL-60 do que contra células Jurkat.

II. Complexos de antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas

As sínteses dos complexos de antimônio(III) foram feitas de acordo com o procedimento descrito na sessão 2.2.10. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 5.8) e por seus espectros de infravermelho (Tabela 5.9) e ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 5.10 e 5.11).

Para os complexos de antimônio(III) os resultados de microanálises e medidas de condutimetria sugerem a formação de [(dicloro-2-piridinoformamida tiossemicarbazonato)antimônio(III)], [Sb(2Am4DH)Cl₂] (4) e [(dicloro-N(4)-metil-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)antimônio(III)], [Sb(2Am4M)Cl₂] (5). Para o derivado N(4)-fenil- (H2Am4Ph) foram obtidos dois complexos: [(triclouro-N(4)-fenil-triazo)antimônio(III)] [Sb(H2Triazo4Ph)₂Cl₃] (6) e tetracloroantimoniato de µ-clorobis[(cloro-N(4)-fenil-2-piridinoformamidatiossemicarbazonato)antimônio(III)] [Sb₂(Am4Ph)₂Cl₃][SbCl₄] (7). No composto (6) ocorre a ciclização da tiossemicarbazona, como discutido mais adiante. O composto (7) pareceria conter um cátion [Sb₂(Am4Ph)₂Cl₃]⁺ e um ânion[SbCl₄]⁻, de acordo com a condutividade molar do composto, que é característica de eletrólitos 1:1. No cátion os dois íons antimônio(III) estariam unidos por uma ponte de cloreto (Ver Figura 5.8). Não

conseguimos obter monocristais do complexo, mas foi possível fazer espectros de infravermelho e RMN. De fato, a síntese do complexo (7) foi feita na presença de um ligeiro excesso de metal com o intuito de se evitar a ciclização do ligante que ocorreu no complexo (6).

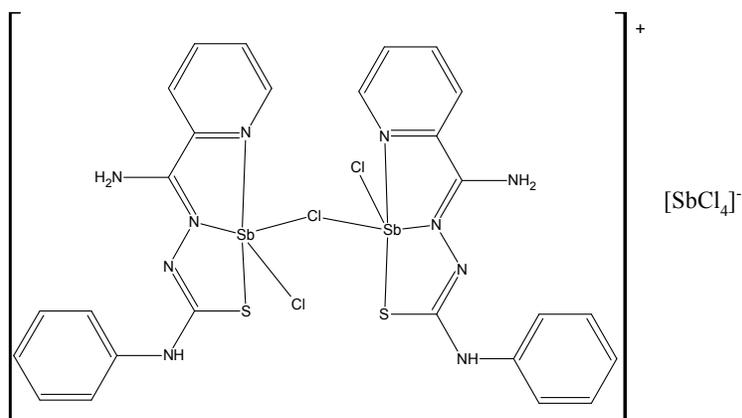


Figura 5.8 - Representação da estrutura proposta para o complexo $[Sb_2(Am4Ph)_2Cl_3][SbCl_4]$.

Tabela 5.8 – Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas.

Composto	% C	% H	%N	Fórmula Molecular	MM (g mol^{-1})	Λ_M^* ($\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$)
$[Sb(2AmDH)Cl_2]$ (4)	21.65 (21.73)	1.92 (2.08)	17.43 (18.10)	$C_7H_8Cl_2N_5SSb$	386,90	15,60
$[Sb(2Am4M)Cl_2]$ (5)	23,95 (23,97)	2,36 (2,51)	17,33 (17,47)	$C_{26}H_{20}Cl_3N_8S_2Sb$	400,93	20,05
$[Sb(H2Triazo4Ph)_2Cl_3]$ (6)	42.20 (42.39)	2.98 (2.74)	14.20 (15.21)	$C_{26}H_{20}Cl_3N_8S_2Sb$	736,74	27,62
$[Sb_2(Am4Ph)_2Cl_3][SbCl_4]$ (7)	27,87 (27,06)	2,15 (2,10)	12,49 (12,14)	$C_{26}H_{24}Cl_7N_{10}S_2Sb_3$	1154,12	67,03

* = $\Lambda_M (\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}); 10^{-3} mol.L^{-1}$ em DMF.

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) encontram-se na Tabela 5.9. A vibração atribuída a $\nu(C=N)$, que encontra-se em 1597-1611 cm^{-1} nos espectros das tiossemicarbazonas livres desloca-se para 1552-1579 cm^{-1} nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico^{3,10}.

A vibração $\nu(C=S)$, observada em 787-795 cm^{-1} nos espectros das bases livres, desloca-se para 722-787 cm^{-1} nos espectros dos complexos (4), (5) e (7), sugerindo a coordenação do enxofre na forma de tiolato. Para o complexo (6) a vibração $\nu(C=S)$ se encontra em 794 cm^{-1} ,

¹⁰ N. C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176–1186.

com um deslocamento de apenas 1 cm⁻¹ em relação ao ligante livre, o que indica a coordenação do enxofre na forma de tiona⁴.

A vibração atribuída à deformação do anel da piridina no plano, situada em 600-606 cm⁻¹ nos espectros dos ligantes, sofre um deslocamento para 540-590 cm⁻¹ nos espectros de (4), (5) e (7). Esses resultados sugerem que nestes complexos a piridina estaria envolvida na coordenação. Já no espectro de (6) banda atribuída à ρ (py) não sofre deslocamento, sugerindo que o nitrogênio heteroaromático não estaria envolvido na coordenação^{1,2}.

Novas absorções em 415-441 cm⁻¹ e 334-352 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações ν (Sb-N) e ν (Sb-S) respectivamente. A nova banda observada em 244-248 cm⁻¹ foi atribuída à vibração ν (Sb-N_{py}) nos complexos (4), (5) e (7), sugerindo mais uma vez que o nitrogênio heteroaromático estaria envolvido na coordenação^{5,11}. No espectro do complexo (6), as absorções relativas a ν (Sb-N) e ν (Sb-N_{py}) não foram observadas, sugerindo que a coordenação neste caso ocorreria apenas pelo enxofre. As novas absorções em 282-340 cm⁻¹ nos espectros dos complexos foram atribuídas a vibrações ν (Sb-Cl)⁵. É interessante ressaltar que três absorções referentes a ν (Sb-Cl) foram observadas no espectro de 7, de acordo com a presença de três tipos diferentes de ligação Sb-Cl.

Tabela 5.9 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm⁻¹) de 2-piridinofornamida tiossemicarbazonas e de [Sb(2AmDH)Cl₂] (4), [Sb(2Am4M)Cl₂] (5), [Sb(H2Triazo4Ph)₂Cl₃] (6) e [Sb₂(Am4Ph)₂Cl₃][SbCl₄] (7) – suportes: KBr (4000-400 cm⁻¹); CsI (400-200cm⁻¹)

Composto	ν (NH)	ν (CN)	ν (CS)	ρ (py)	ν (MN)	ν (MS)	ν (MCl)	ν (MN _{py})
H2Am4DH	3421F	1611F	787m	606m	-	-	-	-
[Sb(2AmDH)Cl ₂] (4)	3424F	1579F	727m	558m	415f	352f	303m	248f
H2Am4M	3367F	1606m	797m	600m	-	-	-	-
[Sb(2Am4M)Cl ₃] (5)	3391F	1552F	722f	540m	441f	351f	302f	244m
H2Am4Ph	3438F	1597m	795m	606m	-	-	-	-
[Sb(H2Triazo4Ph) ₂ Cl ₂] (6)	3441F	1554m	794m	606F	-	334f	296f	-
[Sb ₂ (Am4Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7)	3439F	1552m	787m	590m	430f	340m	282m 327f 340f	246f

F= forte; m= média; f= fraca

¹¹ D. Yin, J. Zhai, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 339–345.

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos (4), (5) e (7) a ausência do sinal de N(3)-H indica que os ligantes se encontram desprotonados. O deslocamento dos sinais dos hidrogênios da piridina e dos carbonos da piridina, C=N e C=S em relação às suas posições nas tiossemicarbazonas livres sugere que o envolvimento do sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ na coordenação. O grande deslocamento do sinal de C=S confirma a passagem de um enxofre de tiona nas tiossemicarbazonas a um enxofre de tiolato nos complexos.

Para o composto (7) as microanálises e medidas de condutimetria são compatíveis com a presença de $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ contendo três átomos de antimônio. O ligante encontra-se desprotonado, de acordo com a ausência do sinal de N(3)-H no espectro de ^1H RMN e com o deslocamento do sinal de C=S no espectro de ^{13}C RMN. A Figura 5.9 apresenta os espectros de ^1H RMN de $\text{H}_2\text{Am4Ph}$ e do complexo $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ (7). A mesma esfera de coordenação do metal, constituída pelos átomos $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ e dois cloretos, além do par de elétrons desemparelhados está presente em outros complexos de antimônio estudados neste trabalho, como complexo (2).

A curva de TG não permitiu provar que o composto seria aquele da formulação proposta, provavelmente porque o resíduo corresponderia a vários óxidos de antimônio.

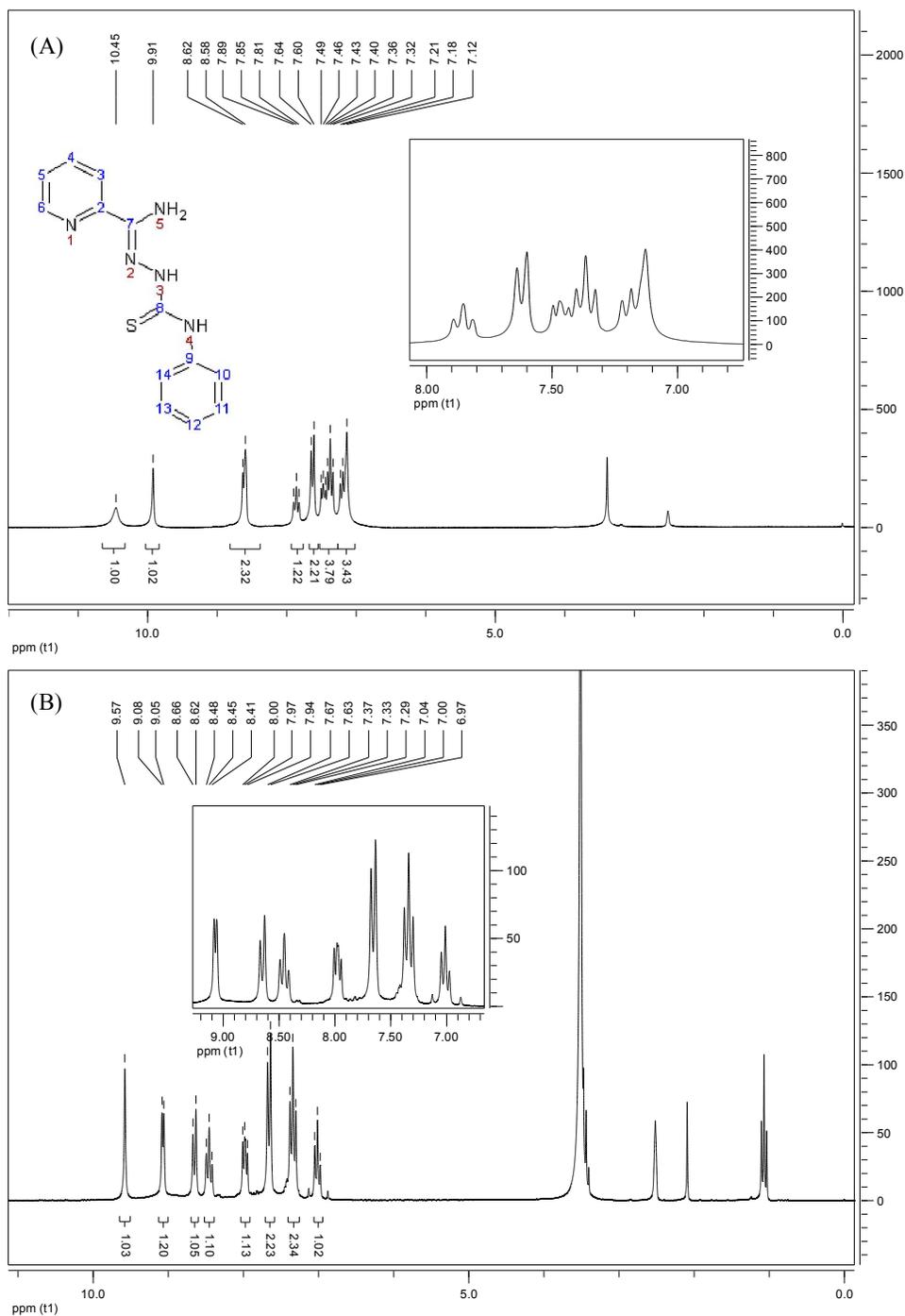


Figura 5.9 - Espectro de ^1H RMN em DMSO-d_6 de a) $\text{H}_2\text{Am}_4\text{Ph}$ e b) $[\text{Sb}_2(\text{Am}_4\text{Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ (7).

Para o complexo (6) o desaparecimento dos sinais de ^1H referentes a $\text{N}(5)\text{H}_2$ e os deslocamentos dos sinais dos hidrogênios em relação às suas posições na tiossemicarbazona original sugerem a ciclização do ligante. Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do ligante triazólico

foram obtidos anteriormente por outros membros de nossa equipe¹² e confirmam que no complexo (6) o ligante está ciclizado.

Esta ciclização já havia sido observada por outros membros de nosso grupo e por outros autores¹³. Assim, no complexo (6) ocorreria ciclização catalisada pelo metal, promovida pelo ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio da amina N(5) sobre o átomo de hidrogênio do grupo tioamida N(4)-H, com o rompimento heterolítico da ligação carbono-nitrogênio da amina, seguido do ataque nucleofílico do nitrogênio N(4) ao carbono C(7) (ver Figura 5.10).

As microanálises do complexo (6) indicam que o metal está coordenado. A curva termogravimétrica mostra um resíduo de 18,62%, compatível com a presença de $\frac{1}{2}$ Sb_2O_3 (teórico: 19,82%). Assim, apesar de os espectros de RMN de (6) não mostrarem alterações com relação ao composto triazólico livre, podemos sugerir a coordenação, seja através do sistema bidentado N-N, seja através do enxofre. Uma vez que não há deslocamentos nos sinais de ^1H e ^{13}C RMN da piridina e do anel triazólico, o mais provável seria que a complexação do ligante triazólico ocorra de modo monodentado, através do enxofre de tiona. A figura 5.11 apresenta os espectros de ^1H RMN da tiossemicarbazona H2Triazo4Ph ciclizada e do complexo $[\text{Sb}(\text{H}_2\text{Triazo4Ph})_2\text{Cl}_2]$ (6).

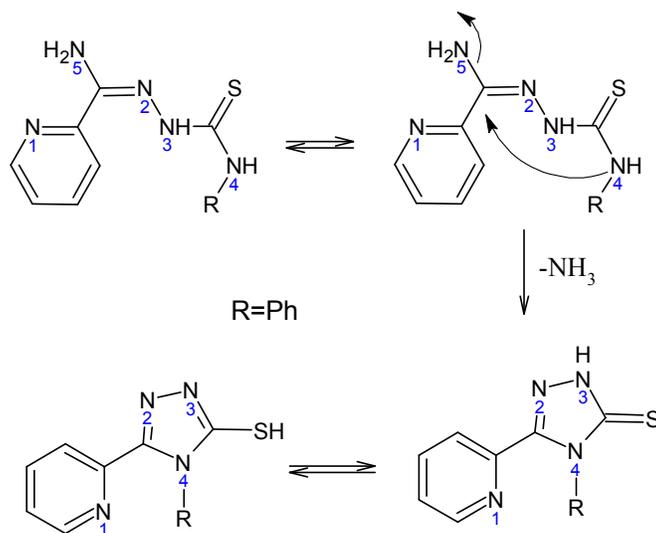


Figura 5.10 - Mecanismo de ciclização de *N*-(4)-2piridinoformamida tiossemicarbazona

¹² I. C. Mendes, Estudo do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de piridina e de piridinoformamida: efeitos da coordenação a metais, Tese de doutorado, UFMG (2007).

¹³ S. Ö. Yildirim, M. Akkurt, A. Çetin, A. Cansiz, M. Sekerc, C. Kazak., Acta Cryst. (2005). E61, o616-o618.

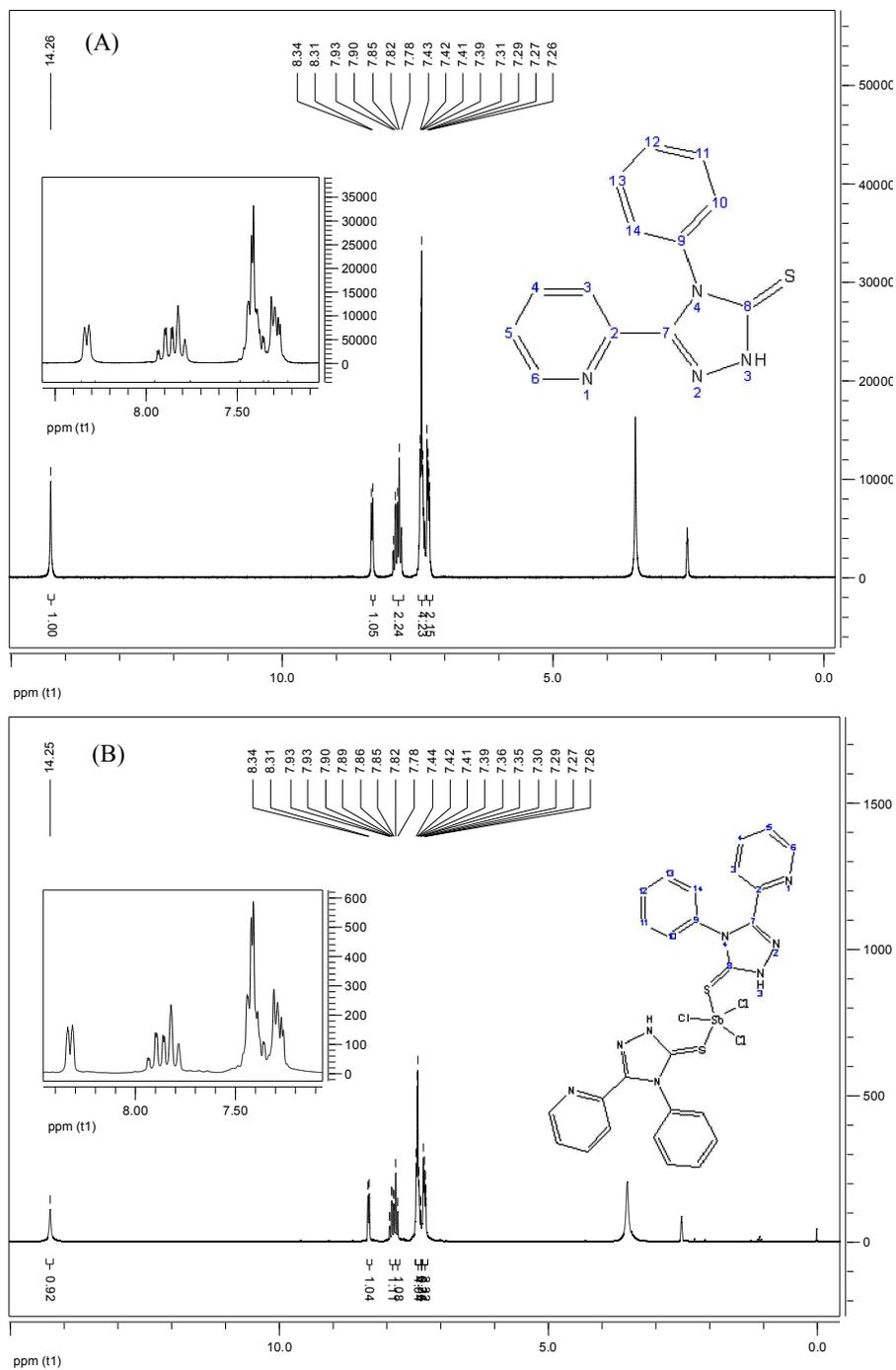


Figura 5.11 - Espectro de ^1H RMN em DMSO-d_6 de a) ligante ciclizado $\text{H}_2\text{Triazo4Ph}$ e b) $[\text{Sb}(\text{H}_2\text{Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$

Tabela 5.10 – Atribuições, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H de $[\text{Sb}(\text{2AmDH})\text{Cl}_2]$ (4), $[\text{Sb}(\text{2Am4M})\text{Cl}_3]$ (5), $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$ (6) e $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ (7) (L = ligante) (DMSO- d_6).

Atribuições	L_{DH}	(4)	M	L_{M}	(5)	M	L_{Ph}	(6)	M	(7)	M
H(3)	8,43	8,52	d	8,46	8,59	d	8,60	8,34	d	8,64	d
H(4)	7,82	8,39	t	7,83	8,41	t	7,85	7,90	td	8,45	t
H(5)	7,43	7,90	t	7,43	7,92	t	7,46	7,37	t	7,97	t
H(6)	8,55	9,00	d	8,55	9,00	d	8,60	8,33	d	9,06	d
N(3)-H	10,05	-	-	10,07	-	-	10,45	14,26	s	-	-
N(4)-H _a	7,92	6,89	lg	8,29	7,29	lg	9,91	-	-	9,57	s
N(4)-H _b	7,78	6,89	lg	-	-	-	-	-	-	-	-
N(5)-H ₂	6,91	sb	lg	6,91	sb	lg	7,12	-	-	sb	-
N(4)-CH ₃	-	-	-	3,03	2,94	s	-	-	-	-	-

s=simpleto; d=duplato, t=triplato, lg= sinal largo,sb=sobreposto

Tabela 5.11 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C de $[\text{Sb}(\text{2AmDH})\text{Cl}_2]$ (4), $[\text{Sb}(\text{2Am4M})\text{Cl}_3]$ (5), $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$ (6) e $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ (7), (L = ligante) (DMSO- d_6).

Atribuições	L_{DH}	(4)	L_{M}	(5)	L_{EPH}	(6)	(7)
C(2)	141,97	141,59	141,97	141,80	149,93	145,04	141,49
C(3)	121,10	122,52	121,05	122,54	121,48	123,95	123,06
C(4)	136,66	141,83	136,59	141,85	136,75	137,24	141,94
C(5)	124,50	127,84	124,46	127,78	124,75	124,91	128,30
C(6)	147,87	144,96	147,92	144,85	147,97	149,05	145,12
C(7)=N	150,18	148,72	150,24	148,82	142,67	149,47	150,25
C(8)=S	176,72	163,69	178,99	162,68	174,73	169,00	159,90
C(9)	-	-	-	-	139,36	135,04	140,63
N(4)-CH ₃	-	-	30,77	30,62	-	-	-

5.3 – Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida:

5.3.1- Avaliação da atividade antimicrobiana

Os complexos de antimônio, $[\text{Sb}(\text{2AmDH})\text{Cl}_2]$ (4), $[\text{Sb}(\text{2Am4M})\text{Cl}_3]$ (5), $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4PH})_2\text{Cl}_3]$ (6) e $[\text{Sb}_2(\text{Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ (7) foram testados quanto a sua atividade antimicrobiana *in vitro*. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.4.1). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.12. Tetraciclina e fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 5.12. Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e seus complexos de antimônio(III) (4-7)

Composto	CIM (µM) <i>S. aureus</i>	CIM (µM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (µM) <i>C. albicans</i>
H2Am4DH	2411,39	>2868,26	391,61
H2Am4M	2229,99	>2675,97	527,63
H2Am4Ph	>921,35	>1861,13	>374,30
[Sb(2AmDH)Cl ₂] (4)	458,34	112,54	>337,08
[Sb(2Am4M)Cl ₂] (5)	669,27	326,32	133,80
[Sb(H2Triazo4Ph) ₂ Cl ₃] (6)	369,87	495,43	>172,49
[Sb ₂ (Am4Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7)	180,51	228,88	>168,96
SbCl ₃	2297,76	754,35	406,25
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Como já mencionamos, coordenação ao antimônio(III) faz melhorar a atividade das tiossemicarbazonas contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A coordenação ao antimônio(III) promoveu um aumento na atividade de cinco a dez vezes com relação às tiossemicarbazonas livres. Dentre os complexos, **7** se mostrou mais ativo contra *S. aureus* e **4** contra *P. aeruginosa*. Ainda que [Sb(2AmDH)Cl₂] (**4**) tenha uma atividade semelhante à da tetraciclina, os valores de CIM são relativamente altos se considerarmos a toxicidade intrínseca do metal.

Contra *C. albicans*, a coordenação ao metal não provocou mudanças significativas na atividade. O complexo [Sb(H2Triazo4Ph)₂Cl₃] (**6**), mesmo contendo em sua estrutura um anel triazol, que é um importante grupo farmacofórico com propriedade fungicida^{14,15,16} demonstrou atividade apenas satisfatória contra *C. albicans*.

5.3.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana

As tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e seus complexos de antimônio(III) foram testados quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia.

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Os resultados, expressos em porcentagem de proliferação celular comparados com o controle (células tratadas com meio de cultura, DMSO 0,1%) são apresentados na Figura 5.11. Cisplatina e etoposídeo, fármacos de referência, foram usados como controles positivos.

¹⁴ X. Chai, J. Zhang, Y. Cao, Y. Zou, Q. Wu, D. Zhang, Y. Jiang, Q. Sun, Eur. J. Med. Chem. 7 (2011) 3167-3176.

¹⁵ H. Lipp, Mycosis 51 (2008) (Suppl. 1) 7-18.

¹⁶ T. Plech, M. Wujec, A. Siwek, U. Kosikowska, A. Malm, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 241-248.

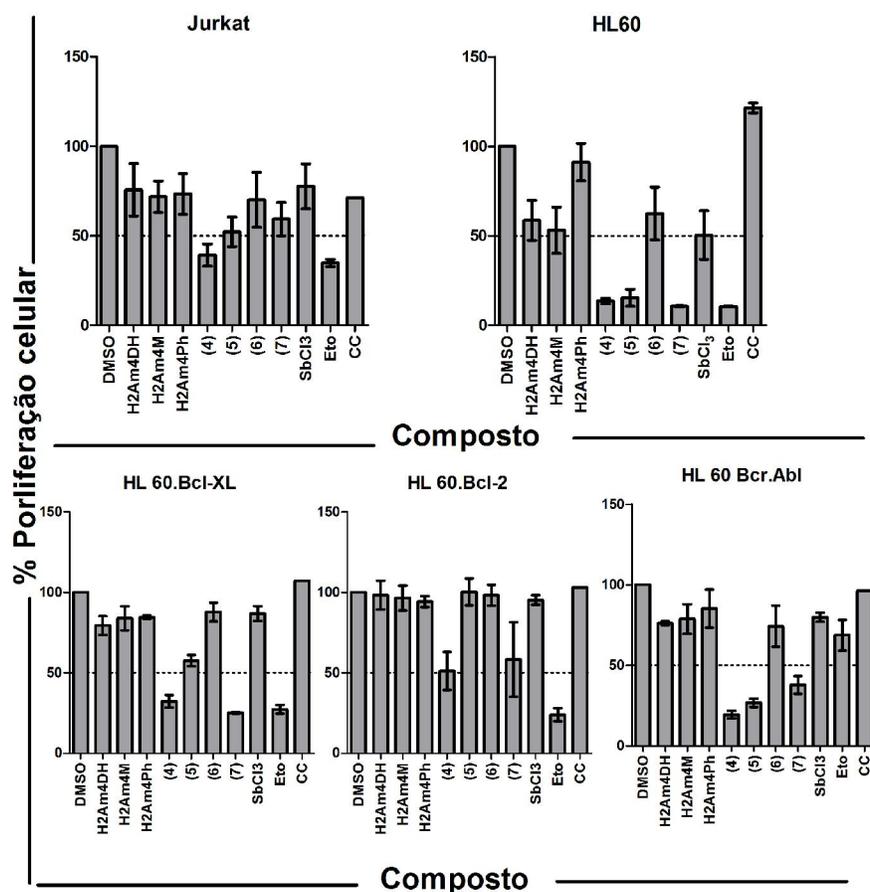


Figura 5.12 - Efeito citotóxico das tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e seus complexos de antimônio(III) ($10 \mu\text{M}$) em linhagens de célula Jurkat, HL-60, HL-60.Bcl-2 HL-60.Bcl-X_L e HL-60.Bcr.Abl. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão da média da porcentagem de proliferação de células comparadas ao controle. Dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Os gráficos apresentados na Figura 5.12 sugerem que a linhagem HL-60 foi mais sensível aos compostos que as demais. A linhagem de células Jurkat foi menos sensível. Enquanto as tiossemicarbazonas mostraram-se pouco ativas, os complexos (4) e (7) mostraram-se muito ativos contra células HL-60.Bcl-X_L e (4), (5) e (7) revelaram-se muito ativos contra células HL-60 e HL-60.Bcr.Abl.

Como já citado no capítulo 4, a super expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e Bcl-X_L em células confere resistência a vários estímulos induzidos por drogas e os resultados obtidos sugerem que o efeito citotóxico dos complexos (4), (5) e (7), ativos contra a linhagem Bcl-X_L, ocorre através de mecanismos que não envolvem apoptose celular. O efeito dos compostos sobre a linhagem HL-60.Bcr-Abl também sugere que esses compostos possuam perfil não-apoptótico, uma vez que Bcr-Abl, a tirosina quinase associada a anormalidade

cromossômica Filadélfia, observada na leucemia mielóide crônica, é um dos genes apoptóticos mais potentes¹⁷. Como os complexos (4), (5) e (7) são também ativos contra células HL-60, pareceria razoável supor que ajam através de mecanismos apoptóticos e não-apoptóticos.

O composto [Sb(H2Triazo4Ph)₂Cl₃] (6) apresenta um IC₅₀ na ordem de nanomolar contra ambas as linhagens testadas, porém a tiossemicarbazona se encontra ciclizada no composto, o que nos impede de comparar sua atividade à do ligante precursor H2Bz4Ph. Portanto, os valores de IC₅₀ para o ligante ciclizado, H2Triazo4Ph, foram obtidos em experimentos paralelos. O valor de IC₅₀ encontrado foi >100 µM tanto para células Jurkat, quanto para HL-60. Considerando que tanto o ligante triazólico quanto o sal de partida não exibem atividade, podemos atribuir a atividade de [Sb(H2Triazo4Ph)₂Cl₃] (6) contra células Jurkat ao complexo *per se*; já no caso da linhagem HL-60, tal afirmação seria imprudente, uma vez que o sal SbCl₃ exibe atividade significativa contra esta linhagem, se bem que menor que a do complexo.

Tabela 5.13. Efeito citotóxico das tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida H2Am4DH, H2Am4M e H2Am4Ph e de seus complexos de antimônio(III) (4-7) em linhagens de célula tumoral HL-60 e Jurkat.

Compostos	HL-60 IC ₅₀ (µM)	Jurkat IC ₅₀ (µM)
H2Am4DH	5,65 ± 1,63	4,35 ± 2,54
H2Am4M	8,27 ± 0,6	5,24 ± 2,54
H2Am4Ph	9,07 ± 1,02	1,28 ± 0,50
[Sb(2AmDH)Cl ₂] (4)	3,72 ± 0,23	3,14 ± 0,32
[Sb(2Am4M)Cl ₂] (5)	3,08 ± 2,06	3,51 ± 2,61
[Sb(H2Triazo4Ph) ₂ Cl ₃] (6)	0,07 ± 0,04	0,13 ± 0,03
[Sb ₂ (Am4Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7)	5,16 ± 1,13	20,69 ± 1,74
SbCl ₃	1,84 ± 1,11	> 100
Cisplatina	0,83 ± 0,05	0,84 ± 0,04

Os dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Com o intuito de investigar a relação entre a inibição da proliferação celular induzida pelas 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) com o processo apoptótico, foi feito o teste de detecção de ADN supdiploide, um indicativo da fragmentação de ADN por apoptose.

¹⁷ A. E. B. B. Silva, G. Brumatti, F.O. Russo, D. R. Green, G. P. A. Mendes, Cell Death Diff. 10 (2003) 592–598.

Tabela 5.14 - Porcentagem de fragmentação de ADN em linhagens de células de leucemia induzida por 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas H2Am4DH, H2Am4M, H2Am4Ph e seus complexos de antimônio(III) (4-7).

Compostos	HL-60	Jurkat
H2Am4DH	60,33 ± 1,38	9,97 ± 5,63
H2Am4M	54,39 ± 3,81	8,78 ± 2,86
H2Am4Ph	42,68 ± 4,67	9,89 ± 1,58
[Sb(2AmDH)Cl ₂] (4)	51,75 ± 3,96	7,95 ± 3,88
[Sb(2Am4M)Cl ₂] (5)	77,29 ± 1,75	10,18 ± 2,84
[Sb(H2Triazo4Ph) ₂ Cl ₃] (6)	72,66 ± 8,39	9,32 ± 4,71
[Sb ₂ (Am4Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7)	86,62 ± 9,13	16,67 ± 9,35
Cisplatina	86,05 ± 4,8	6,95 ± 0,92
SbCl ₃	32,17 ± 3,33	3,17 ± 1,73
DMSO	5,92 ± 3,73	4,46 ± 2,28

Células HL-60 e Jurkat foram tratadas com soluções dos compostos (10µM) por 24 horas. Os dados representam pelo menos dois experimentos independentes, feitos em duplicata.

Validando as observações já feitas neste trabalho, em concentração de 10 µM, os compostos estudados foram capazes de induzir entre 51-86% de fragmentação de ADN nas células HL-60, mas tiveram pouco efeito nas células Jurkat (Tabela 5.14). O aumento da indução de fragmentação de ADN nas células HL-60 demonstra que os compostos estudados possuem um potencial pro-apoptótico nessa linhagem. O complexo [Sb₂(Am4Ph)₂Cl₃][SbCl₄] (7) foi capaz de induzir 86,62 ± 9,13% de fragmentação do ADN em células HL-60, valor próximo ao da cisplatina.

Uma vez que os compostos apresentaram efeito citotóxico contra células Jukart sem, no entanto promover fragmentação de ADN significativa, a atividade estaria ocorrendo por um mecanismo não apoptótico.

5.3.3- Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma Cruzi*

A Tabela 5.15 apresenta os valores de citotoxicidade e os valores de IC₅₀ de inibição do crescimento induzido pelos compostos testados contra forma tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os testes foram realizados de acordo com procedimento descrito na sessão 2.4.4. Curvas dose-resposta foram obtidas para todos os compostos. No entanto em alguns casos não foi possível determinar o valor de IC₅₀.

Tabela 5.15 - Valores de citotoxicidade e IC₅₀ de H2Am4DH, H2Am4M e H2Am4Ph, seus complexos de antimônio(III) contra formas tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Composto	Citotoxicidade (μM)	IC ₅₀ tripo (μM)	IC ₅₀ epimastig. (μM)
H2Am4DH	5,12	53,06	21,01
H2Am4M	<4,78	3,30	3,06
H2Am4Ph	3,68	7,70	1,77
[Sb(2AmDH)Cl ₂] (4)	<2,58	1,55	3,75
[Sb(2Am4M)Cl ₂] (5)	<2,49	1,62	ND
[Sb(H2Triazo4Ph) ₂ Cl ₃] (6)	<1,36	ND	16,73
[Sb ₂ (Am4Ph) ₂ Cl ₃][SbCl ₄] (7)	<0,86	0,52	5,48
benzonidazol	96,06	6,26	6,65
nifurtimox	3,48	2,75	1,88
SbCl ₃	<4,38	65,75	6,79

ND (Não determinado): a curva dose-resposta foi adquirida, porém não possível fazer regressão linear dos dados.

As tiossemicarbazonas H2Am4DH, H2Am4M e H2Am4Ph exibem valores de citotoxicidade bastante similares. Dentre as tiossemicarbazonas H2Am4M é a mais ativa contra a forma tripomastigota e H2Bz4Ph é a mais ativa contra a forma epimastigota. A coordenação promoveu uma melhora na atividade contra a forma tripomastigota em todos os casos em que foi possível determinar o valor de IC₅₀ para complexos e tiossemicarbazonas livres. O complexo [Sb₂(Am4Ph)₂Cl₃][SbCl₄] (7) foi o mais ativo contra forma tripomastigota. Já contra forma epimastigota a coordenação fez aumentar a atividade de H2Am4DH em 5,6 vezes. H2AmPh mostrou-se mais ativo que os complexos (6) e (7) Não foi possível determinar o valor de IC₅₀ para o complexo [Sb(2Am4M)Cl₂] (5).

A complexação ao antimônio demonstrou ser uma estratégia eficiente para aumentar a atividade contra *T. cruzi*; no entanto, os compostos estudados não se revelam bons candidatos á fármacos em razão de sua alta citotoxicidade.

Capítulo 6- Complexos bismuto(III) e antimônio(III) de *N(4)-orto*, *N(4)-meta* e *N(4)-para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas

I. Complexos de bismuto(III) de *N(4)-orto*, *N(4)-meta* e *N(4)-para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas

Neste capítulo foram obtidos complexos de bismuto(III) com *N(4)-orto*-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H_2Ac_4oT), *N(4)-meta*-toluil-2- acetilpiridina tiossemicarbazona (H_2Ac_4mT) e *N(4)-para*-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H_2Ac_4pT) (Figura 6.1). Os resultados sugerem a formação de [*N(4)-orto*-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato]diclorobismuto(III) [$Bi(2Ac_4oT)Cl_2$] (**1**), [*N(4)-meta*-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato]diclorobismuto(III) [$Bi(2Ac_4mT)Cl_2$] (**2**) e [*N(4)-para*-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato]diclorobismuto(III) [$Bi(2Ac_4pT)Cl_2$] (**3**).

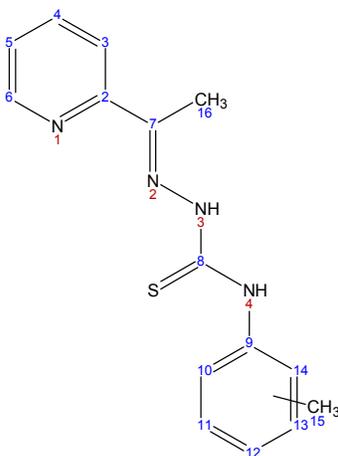


Figura 6.1 – Representação da estrutura genérica de *N(4)-orto* (H_2Ac_4oT), *N(4)-meta* (H_2Ac_4mT) e *N(4)-para*-toluil (H_2Ac_4pT) 2-acetilpiridina tiossemicarbazona.

As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.11. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 6.1), por seus espectros de infravermelho (Tabela 6.2) e ressonância magnética nuclear de 1H , ^{13}C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 6.3 e 6.4).

Tabela 6.1 - Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar, fórmula molecular e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbonos.

Composto	% C	% H	%N	Fórmula Molecular	MM (g.mol ⁻¹)	A_M^* (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
[Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1)	32,69 (31,99)	2,76 (2,68)	10,11 (9,95)	C ₁₄ H ₁₅ BiCl ₂ N ₅ S	563,26	19,72
[Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2)	31,92 (31,99)	2,78 (2,68)	9,80 (9,95)	C ₁₄ H ₁₅ BiCl ₂ N ₅ S	563,26	14,48
[Bi(2Ac4pT)Cl ₂]. 0,5 EtOH (3)	32,92 (31,99)	2,66 (2,68)	10,27 (9,95)	C ₁₄ H ₁₅ BiCl ₂ N ₅ S	586,29	13,11

* = A_M (Ω⁻¹cm² mol⁻¹); 10⁻³ mol.L⁻¹ em DMF.

A presença de 0,5 EtOH em [Bi(2Ac4pT)Cl₂].0,5 EtOH (**3**) foi confirmada pela curva termogravimétrica, que mostra uma perda de massa de 4,5 % (teórico 4,1 %) entre 180 - 230 °C.

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbonos e seus complexos de bismuto(III) encontram-se na Tabela 6.2. A vibração atribuída a ν(C=N), que encontra-se em 1521-1582 cm⁻¹ nos espectros das tiossemicarbonos livres desloca-se para 1547-1585 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico¹⁻³.

A vibração ν(C=S), observada em 821-855 cm⁻¹ nos espectros das bases livres, desloca-se para 786-832 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação do enxofre. O deslocamento observado (23-32 cm⁻¹) está de acordo com a coordenação ao enxofre na forma de tiolato^{2,3}.

A vibração atribuída à deformação do anel da piridina no plano, situada em 621-622 cm⁻¹ nos espectros das tiossemicarbonos aparece em 637-652 cm⁻¹ no espectro dos complexos (**1**-**3**), sugerindo que o nitrogênio heteroaromático estaria ligado ao metal^{1-3,4,5}.

Novas absorções em 424-447 cm⁻¹ e 404-406 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações ν(Bi-N) e ν(Bi-S) respectivamente e as novas bandas em 243-244 são referentes a ν(Bi-N_{py}). As bandas em 322-330 cm⁻¹ foram atribuídas a vibrações ν(Bi-Cl)^{6,7,8}.

¹ R. F. F. Costa, A. P. Rebollo, T. Matencio, H. D. R. Calado, J. D. Ardisson, M. E. Cortês, B. L. Rodrigues, H. Beraldo, J. Coord. Chem. 58 (2005) 1307-131.

² A. P. Rebollo, M. Vieites, D. Gambino, O. E. Piro, E. E. Castellano, C. L. Zani, E. M. S. Fagundes, L. R. Teixeira, A. A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698-706.

³ A. P. Rebollo, G. M. Lima, L. N. Gambi, N. L. Speziali, D. F. Maia, C. B. Pinheiro, J. D. Ardisson, M. E. Cortês, H. Beraldo, Appl. Organomet. Chem. 17 (2003) 945-951.

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

⁵ A. E. Graminha, C. Rodrigues, A. A. Batista, L. R. Teixeira, E. S. Fagundes, H. Beraldo, Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 69 (2008) 1073-1076.

⁶ K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 2nd ed. Wiley-Interscience, New York, 1970, 327.

⁷ G. Q. Zhong, S. R. Luan, P. Wang, Y. C. Guo, Y. R. Chen, Y. Q. Jia, J. Therm. Anal. Calorim., 86 (2006), 775-781.

Tabela 6.2 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para*-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos $[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{oT})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{pT})\text{Cl}_2].0,5 \text{ EtOH}$ (**3**) – suportes: KBr (4000-400 cm^{-1}); CsI (400-200 cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MN})$	$\nu(\text{MS})$	$\nu(\text{MCl})$	$\nu(\text{MN}_{\text{py}})$
H2Ac4oT	3309 F	1582 m	821 m	622 f	-	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{oT})\text{Cl}_2]$ (1)	-	1585 m	789 m	652 f	447 f	406 f	322 f	243 f
H2Ac4mT	3300 F	1521 F	855 m	621 f	-	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]$ (2)	-	1548 F	832 m	637 f	427 f	405 f	330 f	244 f
H2Ac4pT	3298 F	1524 F	822 m	622 f	-	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{pT})\text{Cl}_2].0,5\text{EtOH}$ (3)	-	1547 F	786 m	640 f	424 f	404 f	322 f	244 f

F= forte; m= média; f= fraca

Nos espectros de RMN ^1H dos complexos (**1-3**) observa-se apenas um sinal, característico do isômero *E* para todos os hidrogênios e carbonos. Dentre os hidrogênios do anel da piridina, o sinal de H(6) é o que sofre maior deslocamento pela coordenação. A ausência do sinal de N(3)-H nos complexos indica que as tiossemicarbazonas estão coordenadas na forma aniônica. Os grandes deslocamentos dos sinais de ^{13}C RMN dos carbonos da piridina, de C=N e C=S indicam que os ligantes estariam coordenados de modo tridentado, através do sistema Npy-N-S. O sinal de C=S sofre grandes variações, de acordo com a complexação por enxofre de tiolato^{9,10}. A Figura 6.2 apresenta os espectros de RMN ^1H para H2Ac4mT e $[\text{Bi}(\text{2Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]$ (**2**).

⁸ J. G. Shao, Y. X. Yang, B. W. Li, L. P. Zhang, Y. R. Chen, X. L. Liu, J. Therm. Anal. Calorim., 96 (2009), 277–285.

⁹ A. P. Rebolledo, J. D. Ayala, G. M. Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C. L. Zani, E. M. S. Fagundes, H Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 40 (2005) 467-472.

¹⁰ D. C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M. Souza-Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 3904-3910.

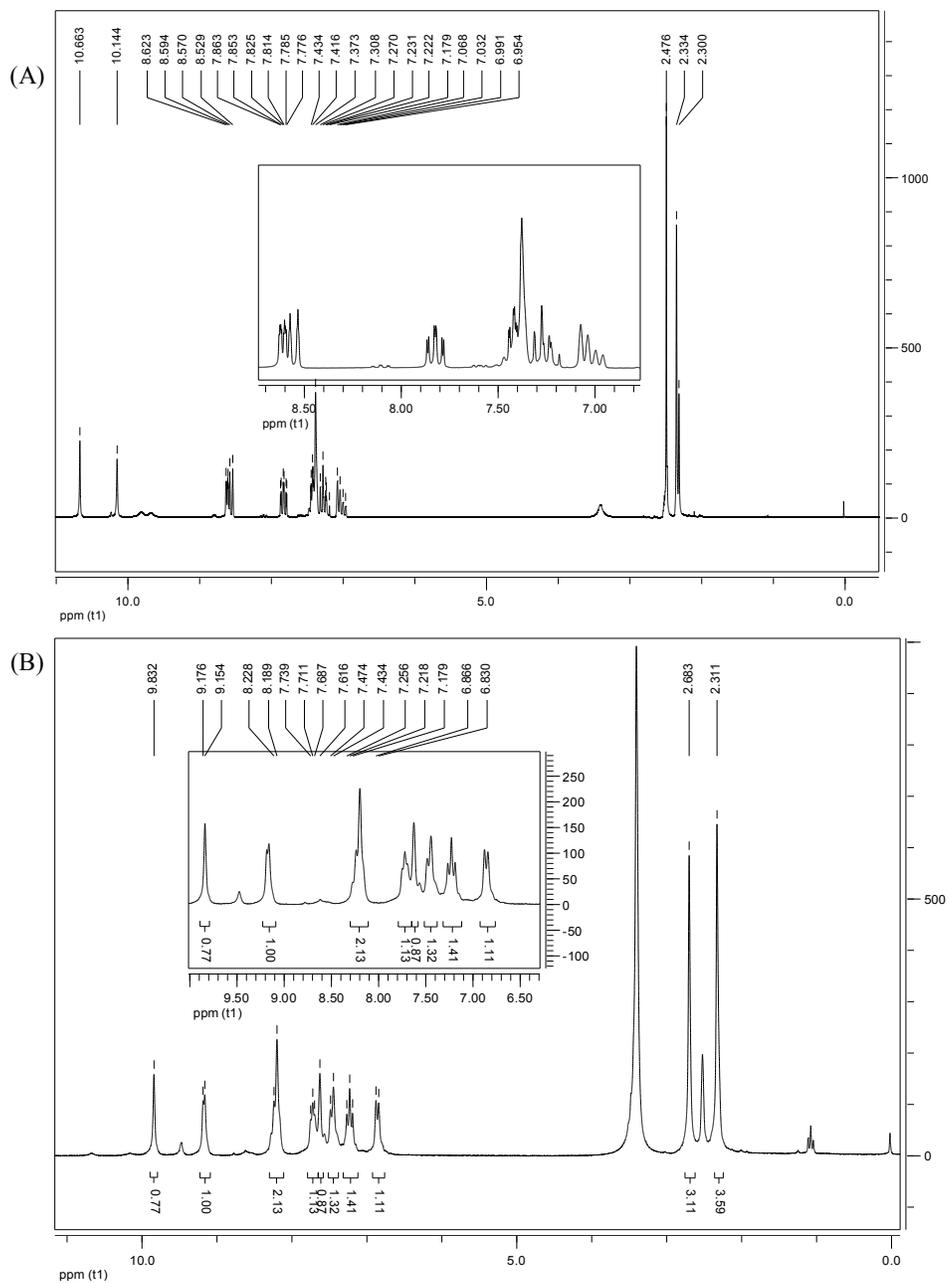


Figura 6.2 - Espectro de RMN ^1H (DMSO-d_6) de: (a) $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{mT}$ e (b) $[\text{Bi}(\text{2Ac}_4\text{mT})\text{Cl}_2]$ (2).

Tabela 6.3 - Atribuições, multiplicidade (M), constante de acoplamento (J) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H de [Bi(2Ac4oT)Cl₂] (1), [Bi(2Ac4mT)Cl₂] (2) e [Bi(2Ac4pT)Cl₂] .0,5 EtOH (3), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{oT}	(1)	M, (J, Hz)	L _{mT}	(2)	M, (J, Hz)	L _{pT}	(3)	M, (J, Hz)
H(3)	8,59	8,62	d	8,53	8,23		8,54	8,18	d (8,09)
H(4)	7,79	8,05	t (8,04)	7,82	8,19	d (8,02)	7,81	7,98	lg
H(5)	7,39	7,48	t(7,80)	7,40	7,62	t(5,23)	7,39	7,54	t (7,50)
H(6)	8,59	9,09	s	8,61	9,16	d(4,52)	8,61	9,14	d (8,51)
N(3)-H	10,65		-	10,63	-	-	10,61	-	s
N(4)-H _a	10,08	10,14	lg	10,13	9,83	lg	10,32	9,83	-
H(15)	2,46	2,24	lg	2,33	2,31	-	2,32	2,65	-
H(16)	3,25	2,46		2,33	2,68		2,53	2,28	

s=singleteo;d=dupleteo;t=tripleto;lg=sinal largo

Tabela 6.4 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C de [Bi(2Ac4oT)Cl₂] (1), [Bi(2Ac4mT)Cl₂] (2) e [Bi(2Ac4pT)Cl₂] .0,5 EtOH (3), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{oT}	(1)	L _{mT}	(2)	L _{pT}	(3)
C(2)	154,59	158,14	154,51	160,23	154,52	158,92
C(3)	121,11	122,98	121,25	121,91	121,19	122,49
C(4)	136,23	125,18	136,52	126,65	136,31	125,43
C(5)	123,93	125,90	124,11	125,53	124,02	121,27
C(6)	148,36	149,38	148,46	149,68	148,42	149,87
C(7)=N	148,58	149,64	149,70	151,11	148,97	150,22
C(8)=S	177,90	172,02	177,15	170,05	177,26	169,00
C(15)	12,55	16,43	20,86	22,23	20,56	20,43
C(16)	12,55	12,41	12,49	17,27	12,47	17,16

6.1-Determinação das estruturas cristalográficas de [Bi(2Ac4oT)Cl₂]_n (1a), [Bi(2Ac4mT)Cl₂DMF]₂ (2a), [Bi(2Ac4pT)Cl₂]_n (3a)

Os complexos (1-3) foram recristalizados por evaporação lenta de soluções dos compostos em acetona:DMF (9:1). Os cristais obtidos foram submetidos à análise por difração de raios-X, que revelou a presença de [Bi(2Ac4oT)Cl₂]_n (1a), [Bi(2Ac4mT)Cl₂DMF]₂ (2a) e [Bi(2Ac4pT)Cl₂]_n (3a). 1a e 3a são polímeros e 2a é dimérico, contendo duas moléculas de DMF como ligantes. Diversas tentativas de recristalização e medidas de difração de raios X

foram feitas, mas obtivemos apenas cristais geminados para **1a** e **3a**. As estruturas foram solucionadas, mas os refinamentos ainda não são satisfatórios.

Os cristais foram montados em fibra de vidro. Dados de difração de raios-X foram coletados em um difratômetro Oxford-Diffracton *GEMINI* (LabCri) com detector de CCD, usando radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$) à temperatura ambiente. A coleta e o tratamento dos dados foram feitos por meio do pacote de programas *Crysalis*¹¹. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos utilizando o programa *SHELXS-97*¹² e refinadas utilizando o programa *SHELXL-97*¹³. Os gráficos foram obtidos pelo programa *ORTEP*^{14,15}.

O resumo da coleção de dados cristalográficos e os detalhes do refinamento da estrutura de $[\text{Bi}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (**2a**) estão descritos na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 Resumo da coleção de dados cristalográficos e refinamento da estrutura de $[\text{Bi}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (**2a**)

Composto	$[\text{Bi}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (2a)
Fórmula empírica	$\text{C}_{18} \text{H}_{22} \text{Bi Cl}_2 \text{N}_5 \text{O S}$
Massa molecular (g mol^{-1})	636,35
Temperatura (K)	293(2)
Comprimento de onda (\AA)	0,7107
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P 21/n
a (\AA)	7,8480(2)
b (\AA)	23,3218(5)
c (\AA)	12,3317(3)
α ($^\circ$)	90
β ($^\circ$)	102,841(2)
δ ($^\circ$)	90
V (\AA^3)	2200,62(9)
Z	4
Densidade calculada (Mg/m^3)	1,921
Coefficiente de absorção, μ (mm^{-1})	8,368
F(000)	1224
Dimensões do cristal (mm)	0,32 x 0,30 x 0,20
Intervalo de θ ($^\circ$)	2,80 a 26,37
Intervalo hkl	-9 \leq h \leq 7 -22 \leq k \leq 29

¹¹ *Crysalis RED*, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK scaling algorithm. *Crysalis RED*, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.

¹² G. M. Sheldrick, *SHELXS-97*; Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.

¹³ G. M. Sheldrick; *SHELXL-97*; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany, 1997.

¹⁴ L. J. Farrugia, *WinGX* suite for small-molecule single-crystal crystallography, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837-838.

¹⁵ L. J. Farrugia; *ORTEP-3* for Windows - a version of *ORTEP-III* with a Graphical User Interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.

	-13<= <=15
Reflexões medidas/únicas/ R _{int}	12345 / 4495/0,0346
Reflexões observadas [I > 2σ (I)]	3575
Total de dados em θ=27,48	99,3%
Correção de absorção	Multi-scan ¹¹
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/restrições/parâmetro	4701 / 0 / 247
S (Qualidade do ajuste de F ²)	1,067
R (abs/all)	0,0404/0,0623
wR (abs/all)	0,0969/0,1096
Δρ min/Max (e Å ⁻³)	-1,116/0,984

O arranjo e a numeração dos átomos para **1a**, **2a** e **3a** estão apresentados nas Figuras 6.3 a 6.5. Os parâmetros geométricos de **2a** são descritos nas Tabelas 6.7 e 6.8. Os dados cristalográficos da tiossemicarbazona H₂Ac₄mT já publicados foram usados para comparação¹⁶.

As estruturas **1a**, **2a** e **3a** são os produtos, diméricos ou poliméricos, formados a partir de monômeros (originalmente pseudo-hexacoordenados ou pseudo-pentacoordenados) que se ligam por meio de pontes de halogênio, resultando em átomos de bismuto heptacoordenados ou hexacoordenados. O mesmo fenômeno é observado em compostos de di-haletos de diorganoestanho(IV)¹⁷.

No caso do complexo (**2a**) o íon bismuto(III) encontra-se heptacoordenado. Cada unidade monomérica é composta por um centro metálico coordenado de forma tridentada a uma tiossemicarbazona desprotonada, dois íons cloreto e uma molécula de DMF. Com a dimerização observa-se a formação de duas pontes de cloreto ligando os centros metálicos dos dois monômeros (figura 6.3).

¹⁶ I. C. Mendes, J. P. Moreira, A. S. Mangrich, S. P. Balena, B. L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263–3270.

¹⁷ C. A. Filgueiras, Quím. Nova 21 (1998) 176-192.

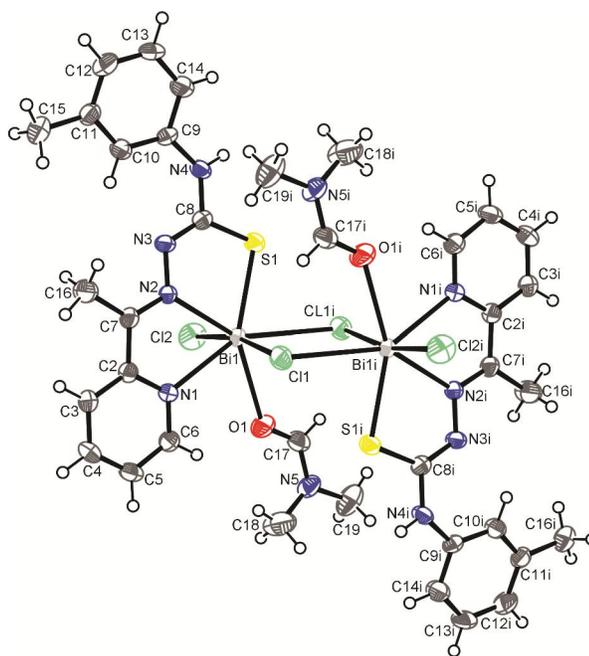


Figura 6.3- Diagrama ORTEP para $[\text{Bi}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]\text{DMF}_2$ (**2a**).

O comprimento de ligação de Bi(1)-Cl(2), 2,5824(11) Å, mais curto que Bi(1)-Cl(1), 2,8885(10) Å, é uma indicação da função de ponte do átomo Cl(1). O comprimento de ligação de Bi(1)-Cl(1)i é de 3,0313(10) Å. Este valor é relativamente grande para uma ligação Bi-Cl, mas pode ser considerada uma ligação covalente¹⁸. O sistema quelante Npy-N-S [S(1),C(8),N(3),N(2), C(7),C(2),N(1)] é essencialmente planar e forma planos quase perpendiculares ao plano Bi₂Cl₂.

Nos complexos (**1a**) e (**3a**) o íon bismuto(III) encontra-se hexacoordenado. Cada unidade monomérica é composta por um centro metálico coordenado de forma tridentada a uma tiossemicarbazona desprotonada e dois íons cloreto. Com a polimerização observa-se a formação de uma única ponte de cloreto (Figuras 6.4 e 6.5). As estruturas (**1a**) e (**3a**) são compostos poliméricos em que a cadeia principal é uma sequencia alternada de átomos de bismuto e cloro formando uma estrutura unidirecional.

¹⁸R. Diemer, U. Dittes, B. Nuber, V. Seifried, W. Opferkuch, B. K. Keppler, *Metal-Based Drugs* 2 (1995) 271-292.

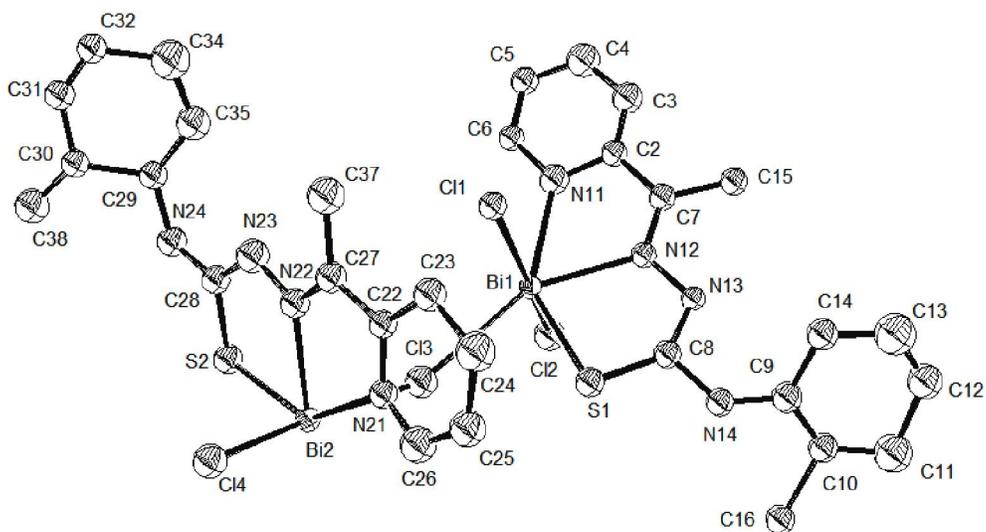


Figura 6.4 - Diagrama ORTEP para $[\text{Bi}(\text{2Ac4oT})\text{Cl}_2]_n$ (**1a**).

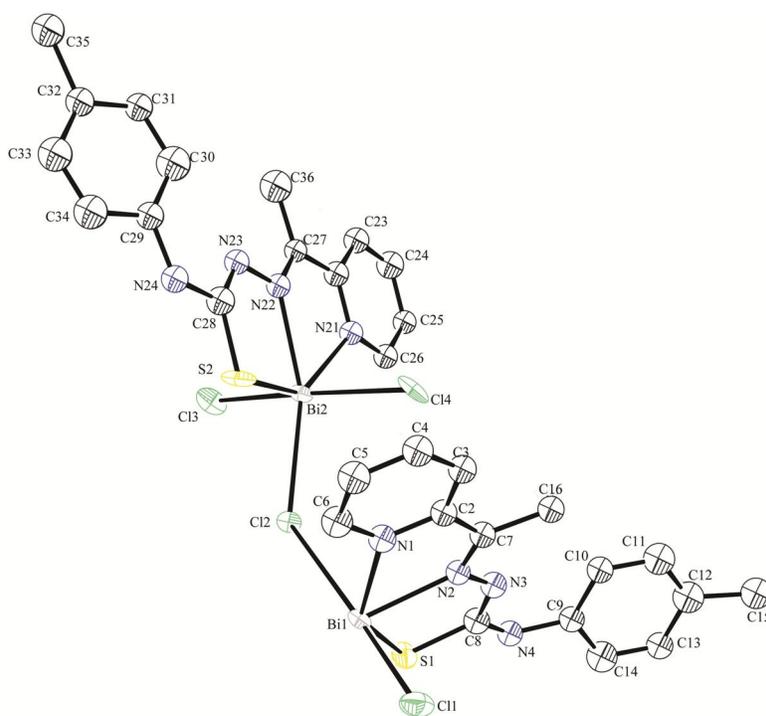


Figura 6.5- Diagrama ORTEP para $[\text{Bi}(\text{2Ac4pT})\text{Cl}_2]_n$ (**3a**).

As Figuras 6.6 e 6.7 mostram o empacotamento molecular de $[\text{Bi}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (**2a**) e $[\text{Bi}(\text{2Ac4pT})\text{Cl}_2]_n$ (**3a**). Observa-se em (**2a**) que a interação entre os dímeros ocorre através de ligações de hidrogênio do tipo $\text{NH}\cdots\text{Cl}$ (tabela 6.8) formando estruturas bidimensionais.

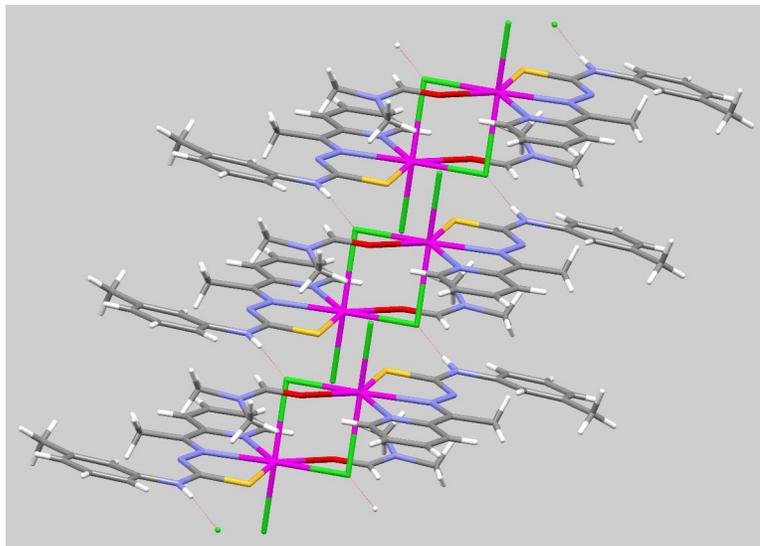


Figura 6.6 - Empacotamento cristalino de $[\text{Bi}(\text{2Ac4}m\text{T})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (**2a**)

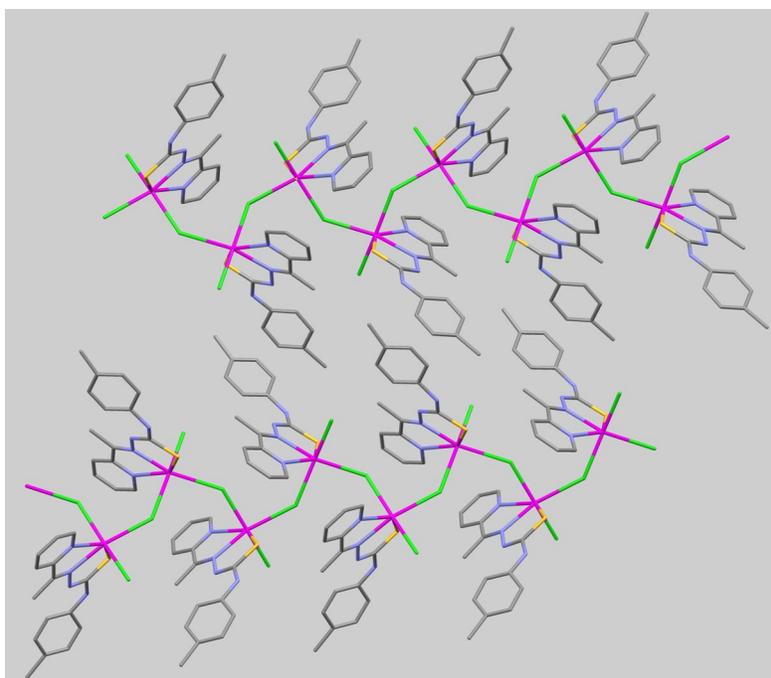


Figura 6.7 - Empacotamento cristalino para $[\text{Bi}(\text{2Ac4}p\text{T})\text{Cl}_2]_n$ (**3a**)

Tabela 6.6 - Principais distâncias (Å), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas nas estruturas de [Bi(2Ac4mT)Cl₂DMF]₂ (**2a**) e H2Ac4mT.

Átomos	Comprimento de ligação (Å)	
	[Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂	H2Ac4mT
Bi(1)-N(1)	2,544(3)	-
Bi(1)-N(2)	2,461(3)	-
Bi(1)-Cl(1)	2,8885(10)	-
Bi(1)-Cl(1)i	3,0313(10)	-
Bi(1)-Cl(2)	2,5824(11)	-
Bi(1)i-Cl(2)i	2,5824(11)	-
Bi(1)-S(1)	2,6540(9)	-
N(1)-C(2)	1,345(5)	1,344(?)
N(1)-C(6)	1,329(4)	1,3343(?)
S(1)-C(8)	1,730(4)	1,671(3)
N(3)-C(8)	1,314(4)	1,359(3)
N(2)-C(7)	1,297(4)	1,289(3)
N(2)-N(3)	1,380(4)	1,381(3)

Tabela 6.7 - Ângulos (°) selecionados para [Bi(2Ac4mT)Cl₂DMF]₂ (**2a**) e H2Ac4mT.

Átomos	Ângulos (°)	
	[Bi(2Ac4mT)Cl ₂ DMF] ₂	H2Ac4mT
N(2)-Bi(1)-N(1)	64,93(9)	-
N(1)-Bi(1)-Cl(2)	85,42(7)	-
N(1)-Bi(1)-S(1)	136,44(7)	-
N(2)-Bi(1)-Cl(1)	89,84(7)	-
N(2)-Bi(1)-Cl(1)#1	145,08(6)	-
Cl(2)-Bi(1)-Cl(1)	168,30(3)	-
Cl(2)-Bi(1)-Cl(1)#1	101,31(3)	-
N(2)-Bi(1)-Cl(2)	90,47(7)	-
N(2)-Bi(1)-S(1)	71,56(6)	-
Cl(2)-Bi(1)-S(1)	93,00(3)	-
N(1)-Bi(1)-Cl(1)	84,13(7)	-
N(1)-Bi(1)-Cl(1)#1	147,90(7)	-
S(1)-Bi(1)-Cl(1)	98,19(3)	-
S(1)-Bi(1)-Cl(1)#1	75,05(3)	-
N(1)-C(2)-C(7)	116,4(3)	115,21(?)
C(2)-C(7)-N(2)	118,6(3)	114,45(?)
C(7)-N(2)-N(3)	114,3(3)	119,0(2)
N(2)-N(3)-C(8)	115,1(3)	118,5(2)
N(3)-C(8)-S(1)	129,2(3)	120,3(2)
S(1)-C(8)-N(4)	114,1(3)	124,9(2)
N(3)-C(8)-N(4)	116,7(3)	114,8(2)
C(8)-N(4)-C(9)	131,3(3)	125,7(2)

Tabela 6.8 - Parâmetros das ligações de hidrogênio (Å e °) em $[\text{Bi}(\text{2Ac4}m\text{T})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (**2a**).

$[\text{Bi}(\text{2Ac4}m\text{T})\text{Cl}_2\text{DMF}]_2$ (2a)	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D-H...A)	(D-H...A)
N(4)... H(4A)...Cl(1)#2		0,86	2,58	3,424(3)	169,3

Transformações de simetria usadas para gerar os átomos equivalentes: #1 -x+2,-y,-z+1 #2 x-1,y,z

6.2- Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

A Tabela 6.9 apresenta dados de ESI-MS para os complexos $[\text{Bi}(\text{2Ac4}o\text{T})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{2Ac4}m\text{T})\text{Cl}_2]$ (**2**), $[\text{Bi}(\text{2Ac4}p\text{T})\text{Cl}_2]$ (**3**). As análises foram realizadas de acordo com procedimento descrito na seção 2.3. Todos os compostos foram solubilizados em MeOH:DMSO (99:1).

Tabela 6.9- Dados de ESI-MS para os complexos $[\text{Bi}(\text{2Ac4}o\text{T})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{2Ac4}m\text{T})\text{Cl}_2]$ (**2**), $[\text{Bi}(\text{2Ac4}p\text{T})\text{Cl}_2]$ (**3**)

Composto	m/z	IR (%)	Atribuição	MS/MS (m/z)	Atribuição
(1)	775,35	100,00	$[\text{Bi}(\text{L})_2]^+$	525,06	$[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$
(2)	775,35	100,00	$[\text{Bi}(\text{L})_2]^+$	525,13	$[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$
(3)	775,25	100,00	$[\text{Bi}(\text{L})_2]^+$	525,06	$[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$

L = representa a tiossemicarbazona na forma aniônica. IR = intensidade relativa.

A figura 6.9 apresenta: o espectro de massas de $[\text{Bi}(\text{2Ac4}o\text{T})\text{Cl}_2]$. Como esperado, os espectros de massa de (**1-3**) são similares uma vez que os ligantes são isômeros e todos os espectros apresentam um pico m/z ~775 correspondente a $[\text{Bi}(\text{L})_2]^+$. Esta espécie foi observada nos espectros de massas dos complexos de bismuto(III) apresentados nos capítulos anteriores.

Novamente a espécie $[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$ foi observada no espectro de massas sequencial como pico m/z ~ 525.

Não foram detectados picos de m/z correspondentes as estruturas propostas para (**1-3**). No entanto, como citado anteriormente, isto não significa que estas espécies não existam no estado sólido, apenas que não são estáveis o suficiente no estado gasoso para serem detectadas¹⁹.

¹⁹ G. G. Briand, N. Buford, M. D. Eelman, N. Aumeerly, L. Chen, T. S. Cameron, K. N. Robertson, Inorg. Chem., 43 (2004) 6495-6500.

BOT POS_091204114737 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,59E6
T: ITMS + c ESI Full ms [50,00-2000,00]

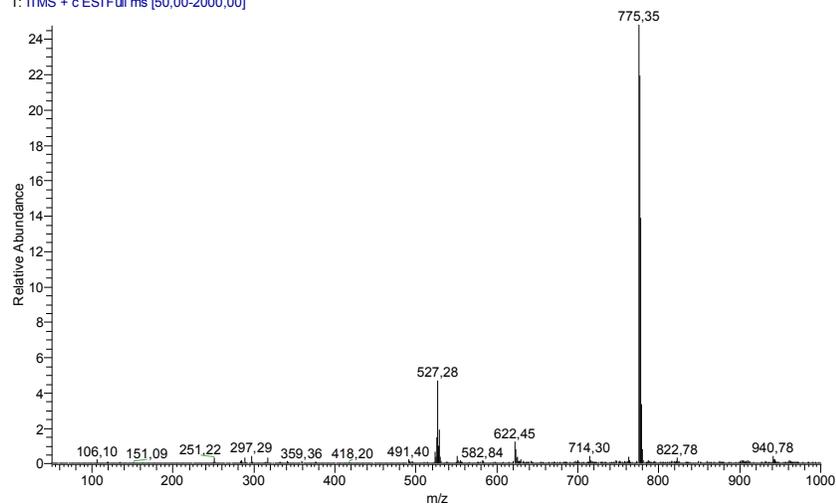


Figura 6.9 - Espectro de massas para $[\text{Bi}(2\text{Ac}4\text{oT})\text{Cl}_2]$ (**1**) no modo positivo.

BOT POS 775 22 eV_091204110304 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 2,46E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 775,00@cid22,00 [210,00-800,00]

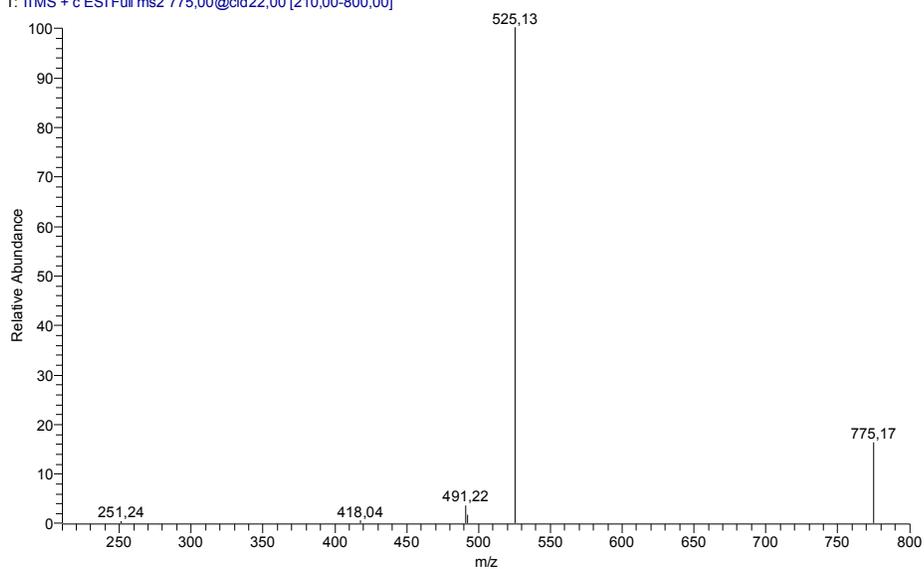


Figura 6.10 - Figura 5.7 – Espectro de massas sequencial (MS/MS) do íon $m/z = 775,17$ correspondente ao pico majoritário do espectro de (**1**), demonstrando a formação da espécie $[\text{Bi}(\text{L})\text{O}(\text{OH})]^+$ a partir de $[\text{Bi}(\text{L}_2)]^+$.

6.3 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de *N(4)-orto*, *N(4)-meta* e *N(4)-para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona

6.3.1 - Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizados teste quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* das tiossemicarbazonas H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT e seus complexos de bismuto(III), [Bi(2Ac4oT)Cl₂] (**1**), [Bi(2Ac4mT)Cl₂] (**2**) e [Bi(2Ac4pT)Cl₂] (**3**) contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), ATCC 6538, bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 10231. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.4.1). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.10. O sal de bismuto (BiCl₃) não foi testado devido à sua baixa solubilidade. Tetraciclina e fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 6.10 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para *N(4)-orto*, *N(4)-meta* e *N(4)-para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos de bismuto(III).

Composto	CIM (µM) <i>S. aureus</i>	CIM (µM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (µM) <i>C. albicans</i>
H2Ac4oT	264,90	1705,46	20,27
H2Ac4mT	114,28	826,36	19,11
H2Ac4pT	60,95	198,85	21,55
[Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1)	6,66	81,34	11,86
[Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2)	8,36	77,38	20,02
[Bi(2Ac4pT)Cl ₂] (3)	20,12	60,80	12,04
BiCl ₃	-	-	-
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Os valores de CIM sugerem que os compostos testados são mais ativos contra *S. aureus* do que contra *P. aeruginosa*. Entre as tiossemicarbazonas a atividade segue a seguinte ordem contra ambos os microorganismos H2Ac4oT<H2Ac4mT<H2Ac4pT. A coordenação ao bismuto melhora a atividade nos dois casos, mas o aumento é mais pronunciado contra a bactéria gram-positiva.

Entre os complexos [Bi(2Ac4oT)Cl₂] (**1**) foi o mais ativo contra *S. aureus* e mostrou-se cerca de quarenta vezes mais ativo do que a tiossemicarbazona de partida. A atividade antibacteriana do complexo (**2**) foi quase treze vezes maior que a da tiossemicarbazonas livre e

o complexo (3) apresentou uma pequena melhora na sua atividade quando comparado a H2Ac4pT. Os resultados sugerem que a associação da tiossemicarbazona ao bismuto no mesmo composto pode ser uma estratégia interessante para redução de doses. Nenhum dos compostos estudados apresenta atividade superior à da tetraciclina, fármaco de controle.

A coordenação ao bismuto(III) resultou em significativo aumento de atividade contra *P. aeruginosa* e em um alargamento do espectro de atividades das tiossemicarbazonas, que, complexadas, tornam-se ativas contra a bactéria gram-negativa. Os complexos são mais ativos que a tetraciclina usada como referência. Considerando que a resistência a drogas usadas na clínica é um problema recorrente, e que os complexos de bismuto(III) demonstraram ser ativos contra bactérias gram-negativas, os resultados são promissores e sugerem a importância de uma investigação mais profunda do tema.

As tiossemicarbazonas apresentam valores de CIM bastante próximos contra o fungo *C. albicans*. A coordenação ao bismuto(III) fez aumentar cerca de duas vezes a atividade das tiossemicarbazonas H2Ac4oT e H2Ac4pT. O complexo (2) não apresenta melhora significativa com relação à tiossemicarbazona livre. No entanto, todos os compostos, ligantes livres e complexos, apresentam atividade superior à do fluconazol.

6.3.2- Avaliação da atividade citotóxica frente a células de leucemia humana

As tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) foram testados quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia humana HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Foram determinados valores de IC₅₀ para linhagens estudadas e os dados estão apresentados na Tabela 6.11.

Tabela 6.11 - Efeito citotóxico de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) (1-3) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.

Compostos	HL-60 IC ₅₀ (μM)	Jurkat IC ₅₀ (μM)
H2Ac4oT	0,04 ± 0,02	0,26 ± 0,10
H2Ac4mT	4,23 ± 1,13	13,69 ± 2,73
H2Ac4pT	0,33 ± 0,15	0,29 ± 0,26
[Bi(2Ac4oT)Cl ₂] (1)	0,24 ± 0,11	7,65 ± 0,82
[Bi(2Ac4mT)Cl ₂] (2)	4,32 ± 1,63	2,20 ± 0,60
[Bi(2Ac4pT)Cl ₂] (3)	1,08 ± 0,57	97,1 ± 2,47
BiCl ₃	101,32 ± 5,23	86,54 ± 7,10
Cisplatina	0,83 ± 0,05	0,86 ± 0,70

Os dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Os valores de IC₅₀ sugerem que a tiossemicarbazona H2Ac4oT é a mais ativa contra as duas linhagens testadas, seguida por H2Ac4pT e H2Ac4mT.

O complexo [Bi(2Ac4oT)Cl₂] (**1**) é o mais ativo contra células HL-60 e [Bi(2Ac4mT)Cl₂] (**2**) é o mais ativo contra células Jurkat. A complexação ao bismuto(III) diminui a citotoxicidade contra as duas linhagens em todos os casos. Com exceção de [Bi(2Ac4mT)Cl₂] (**2**) que é mais ativo que a tiossemicarbazona livre contra células Jurkat. H2Ac4oT e H2Ac4pT apresentam melhor atividade que cisplatina contra ambas as linhagens.

Neste caso, a complexação não se mostrou uma estratégia eficiente para redução de dose.

II. Complexos de antimônio(III) de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas

Neste capítulo foram obtidos complexos de antimônio(III) com *N*(4)-orto-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4oT), *N*(4)-meta-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4mT) e *N*(4)-para-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4pT) (Figura 6.1). Os resultados sugerem a formação de [*N*(4)-orto-toluil-2-acetilpiridinatiosemicabazonato]dicloroantimônio(III) [Sb(2Ac4oT)Cl₂] (**4**), [*N*(4)-meta-toluil-2-acetilpiridina tiossemicabazonato]dicloroantimônio(III) [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (**5**) e [*N*(4)-para-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicabazonato]dicloroantimônio(III) [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (**6**).

As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.12. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 6.12) e por seus espectros de infravermelho (Tabela 6.13) e ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 6.14 e 6.15).

Tabela 6.12 – Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.

Composto	% C	% H	%N	Fórmula molecular	MM (g·mol ⁻¹)	Λ_M^* (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
[Sb(2Ac4oT)Cl ₂] (4)	38,06 (37,85)	3,20 (3,18)	11,70 (11,77)	C ₁₅ H ₁₅ Cl ₂ N ₄ SSb	476,04	21,99
[Sb(2Ac4mT)Cl ₂] (5)	37,87 (37,85)	3,19 (3,18)	11,46 (11,77)	C ₁₅ H ₁₅ Cl ₂ N ₄ SSb	476,04	14,26
[Sb(2Ac4pT)Cl ₂] (6)	38,15 (37,85)	3,19 (3,18)	11,84 (11,77)	C ₁₅ H ₁₅ Cl ₂ N ₄ SSb	476,04	19,31

* = Λ_M (Ω⁻¹cm² mol⁻¹); 10⁻³ mol.L⁻¹ em DMF.

As principais bandas nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) encontram-se na Tabela 6.13. A vibração atribuída a $\nu(\text{C}=\text{N})$, que se encontra em 1521-1582 cm^{-1} nos espectros das tiossemicarbazonas livres desloca-se para 1503-1538 cm^{-1} nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico¹⁻³.

A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em 821-855 cm^{-1} nos espectros das bases livres, desloca-se para 796-840 cm^{-1} nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação do enxofre⁴. A vibração atribuída à deformação do anel da piridina no plano, situada em 621-622 cm^{-1} nos espectros das tiossemicarbazonas aparece em 602-606 cm^{-1} no espectro dos complexos (**1-3**), sugerindo que o nitrogênio heteroaromático estaria coordenado ao metal¹⁻⁵.

Novas absorções em 437-449 cm^{-1} e 408-412 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Sb}-\text{N})$ e $\nu(\text{Sb}-\text{S})$ respectivamente. As bandas de $\nu(\text{Sb}-\text{N}_{\text{py}})$ aparecem em 244-246 cm^{-1} e as bandas em 322-326 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações $\nu(\text{Sb}-\text{Cl})$ ^{6,20}

Tabela 6.13 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de *N(4)-orto*, *N(4)-meta* e *N(4)-para*-toluol 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos $[\text{Sb}(\text{2Ac4oT})\text{Cl}_2]$ (**4**), $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ (**5**) e $[\text{Sb}(\text{2Ac4pT})\text{Cl}_2]$ (**6**) - suportes: KBr (4000-400 cm^{-1}); CsI (400-200 cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MN})$	$\nu(\text{MS})$	$\nu(\text{MCl})$	$\nu(\text{MN}_{\text{py}})$
H2Ac4oT	3309F	1582m	821m	622f	-	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{2Ac4oT})\text{Cl}_2]$ (4)	-	1505	796	606	449	412	322	244
H2Ac4mT	3300F	1521F	855m	621f	-	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ (5)	-	1503	840	606	437	408	326	246
H2Ac4pT	3298F	1581F	822m	622f	-	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{2Ac4pT})\text{Cl}_2]$ (6)	-	1538	816	602	449	408	322	248

F= forte; m= média; f= fraca

Nos espectros de RMN ^1H dos complexos (**4-6**) observa-se apenas um sinal, para todos os hidrogênios e carbonos, característico do isômero *E*. Dentre os hidrogênios do anel da piridina, o sinal de H(6) é o que sofre maior deslocamento pela coordenação. A ausência do sinal de N(3)-H nos complexos indica que as tiossemicarbazonas estão coordenadas na forma aniônica. O grande deslocamento dos sinais de ^{13}C dos carbonos da piridina, de C=N e C=S indica que o metal estaria coordenado de modo tridentado, através do sistema Npy-N-S. O sinal de C=S sofre grandes variações, de acordo com a complexação por enxofre de tiolato. A Figura 6.11 apresenta os espectros de RMN ^1H de H2Ac4pT e $[\text{Sb}(\text{2Ac4pT})\text{Cl}_2]$.

²⁰ .D. Yin, J. Zhai, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 339–345.

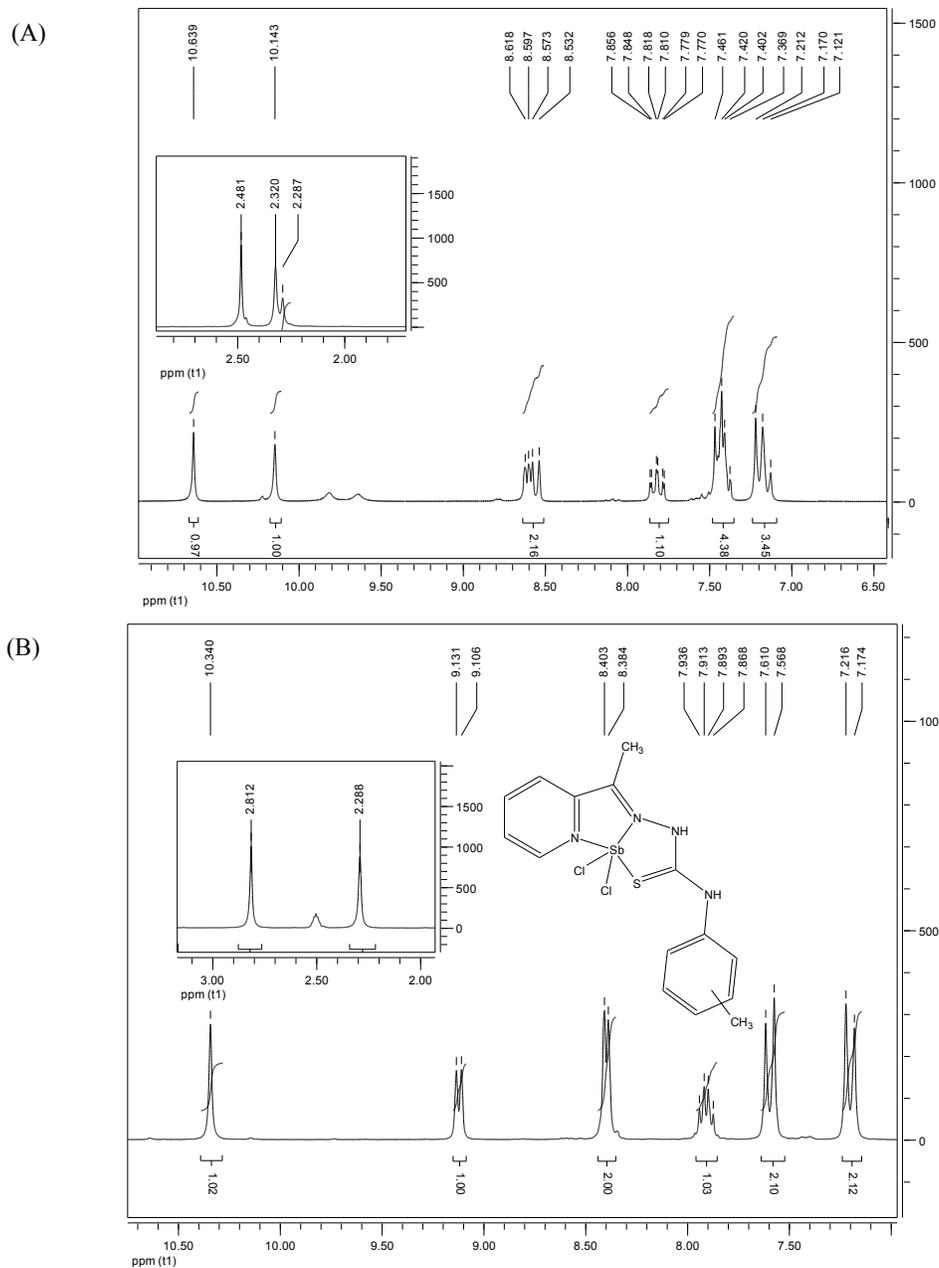


Figura 6.11 - Espectro de RMN ^1H (DMSO-d_6) de (a) $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pT}$ e (b) $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{pT})\text{Cl}_2]$ (6).

Tabela 6.14 – Atribuições, multiplicidade (M), constante de acoplamento (J) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹H de [Sb(2Ac4oT)Cl₂] (4), [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5) e [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (6), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{oT}	(4)	M, (J, Hz)	L _{mT}	(5)	M(J, Hz)	L _{pT}	(6)	M, (J, Hz)
H(3)	8,59	8,27	d(7,60)	8,53	7,47	d(8,19)	8,54	7,22	d(8,32)
H(4)	7,79	8,37	t(7,22)	7,82	8,40	t(3,68)	7,81	8,39	td(3,83)
H(5)	7,39	7,87	t(6,05)	7,40	7,26	t(7,64)	7,39	7,90	t(4,53)
H(6)	8,59	9,07	d(4,67)	8,61	9,13	d(4,89)	8,61	9,11	d(4,93)
N(3)-H	10,65	-	-	10,63	-	-	10,61	-	s
N(4)-H _a	10,08	9,96	lg	10,13	10,35	lg	10,32	10,34	-
H(15)	2,46	2,25	s	2,33	2,33	s	2,32	2,28	-
H(16)	3,25	2,62	s	2,33	2,83	s	2,53	2,81	s

s = singlete; d= duplete; t = tripleto;lg= sinal largo.

Tabela 6.15 - Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³C de [Sb(2Ac4oT)Cl₂] (4), [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5) e [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (6), (L = ligante) (DMSO-d₆).

Atribuições	L _{oT}	(4)	L _{mT}	(5)	L _{pT}	(6)
C(2)	154,59	151,65	154,51	151,80	154,52	151,33
C(3)	121,11	126,20	121,25	124,23	121,19	129,00
C(4)	136,23	143,37	136,52	142,27	136,31	142,20
C(5)	123,93	128,13	124,11	128,56	124,02	127,35
C(6)	148,36	145,51	148,46	144,50	148,42	144,71
C(7)=N	148,58	140,56	149,70	144,83	148,97	137,28
C(8)=S	177,90	167,20	177,15	167,84	177,26	167,72
C(15)	12,55	17,16	20,86	21,21	20,56	20,40
C(16)	12,55	18,87	12,49	16,88	12,47	16,86

6.4 – Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de N(4)-orto, N(4)-meta e N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona:

6.4.1- Avaliação da atividade antimicrobiana

Como para os complexos de bismuto(III) foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos complexos de antimônio(III), [Sb(2Ac4oT)Cl₂] (4), [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5) e [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (6) contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), ATCC 6538, bactérias gram-negativas (*Pseudomonas*

aeruginosa), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 10231. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.16. O sal de antimônio (SbCl_3) foi testado como controle.

Tabela 6.16 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos de antimônio(III).

Composto	CIM (μM) <i>S. aureus</i>	CIM (μM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (μM) <i>C. albicans</i>
H2Ac4oT	264,90	1705,46	20,27
H2Ac4mT	114,28	826,36	19,11
H2Ac4pT	60,95	198,85	21,55
[Sb(2Ac4oT)Cl ₂] (4)	220,13	185,56	32,24
[Sb(2Ac4mT)Cl ₂] (5)	133,48	122,89	14,30
[Sb(2Ac4pT)Cl ₂] (6)	95,23	86,63	15,54
SbCl ₃	2297,76	754,35	573,53
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Os valores de CIM sugerem que as tiossemicarbazonas testadas são mais ativas contra *S. aureus* enquanto os complexos de antimônio(III) são mais ativos contra *P. aeruginosa*.

[Sb(2Ac4oT)Cl₂] (4) mostrou uma pequena melhora na atividade contra *S. aureus* com relação à tiossemicarbazona livre, enquanto (5) e (6) mostraram ser menos ativos que os ligantes livres.

A coordenação a antimônio(III) melhorou a atividade dos complexos contra *P. aeruginosa* de duas a nove vezes com relação às tiossemicarbazonas correspondentes. [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (6) foi o composto mais ativo e além disso apresenta valor de MIC menor que o da tetraciclina, fármaco de controle.

As tiossemicarbazonas apresentam valores de CIM bastante próximos contra *C. albicans*. A coordenação promoveu melhora pouco significativa na atividade das tiossemicarbazonas H2Ac4mT e H2Ac4pT. O complexo (4) apresenta atividade inferior ao ligante livre. No entanto, todos os compostos, ligantes livres e complexos, apresentam atividade superior à do fluconazol.

6.4.2 - Atividade citotóxica contra células de leucemia humana

A atividade citotóxica dos complexos de antimônio(III) foi testada frente a linhagens de células de leucemia HL-60 e Jurkat.

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Foram determinados valores de IC₅₀ para linhagens estudadas e os dados estão apresentados na Tabela 6.17. Cisplatina, fármaco utilizado na clínica foi usada como controle positivo.

Tabela 6.17- Efeito citotóxico de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus complexos (**4-6**) em linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat.

Composto	HL60	Jurkat
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
H2Ac4 <i>o</i> T	0,07 [0,03-0,21]	0,16 [0,03-0,91]
H2Ac4 <i>m</i> T	6,75 [2,45-18,41]	12,03 [8,260-17,52]
H2Ac4 <i>p</i> T	0,21 [0,06-0,74]	0,46 [0,13-1,58]
[Sb(2Ac4 <i>o</i> T)Cl ₂] (4)	0,18 [0,03-0,10]	0,35 [0,05-2,33]
[Sb(2Ac4 <i>m</i> T)Cl ₂] (5)	0,02 [0,01-0,04]	0,17 [0,04-0,74]
[Sb(2Ac4 <i>p</i> T)Cl ₂] (6)	0,27 [0,15-0,47]	0,36 [0,05-2,75]
SbCl ₃	1,95 [0,72-5,23]	> 100
Cisplatina	0,84 [0,41-1,71]	0,69 [0,4-0,19]

Os valores de IC₅₀ e os intervalos de confiança 95% (CI 95%) foram obtidos por regressão não linear dos resultados representativos de pelo menos três experimentos independentes.

De forma geral, as tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) demonstram uma atividade dose-resposta dependente. Como já mencionamos anteriormente a atividade das tiossemicarbazonas segue a ordem H2Ac4*m*T < H2Ac4*p*T < H2Ac4*o*T para as duas linhagens estudadas. H2Ac4*p*T e H2Ac4*o*T apresentam valores de IC₅₀ na ordem de nanomolar. Como já observado, os resultados sugerem que a posição do grupo toluil tem influência na atividade²¹.

A coordenação ao antimônio(III) faz aumentar significativamente a atividade de H2Ac4*m*T contra as duas linhagens. O complexo (**5**) apresenta atividade contra HL-60 na escala de nanomolar e é mais de 300 vezes mais ativo que a tiossemicarbazona livre, enquanto que

²¹ K. S. O. Ferraz, L. Ferandes, D. Carrilho, M. C. X. Pinto, M. F. Leite, E. M. S. Fagundes, N. L. Speziali, I. C. Mendes, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 17(2009) 7138-7144.

[Sb(2Ac4oT)Cl₂] (**4**) é menos ativo que a tiossemicarbazona livre e [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (**6**) não apresenta melhora na atividade com relação ao ligante livre, em ambas linhagens de célula.

Apesar de a complexação ao metal não se apresentar como uma boa estratégia para aumentar a atividade no caso de H2Ac4pT e H2Ac4oT, estas apresentam atividades em concentrações na ordem de nanomolar, e por isso, é válido aprofundar os estudos quanto ao mecanismo de ação dessa série de compostos.

Novamente, com o intuito de investigar a relação entre a inibição da proliferação celular com o processo apoptótico, foi feito o teste de detecção de ADN subdiploide, um indicativo da fragmentação de ADN por apoptose. Os dados são apresentados na Tabela 6.18.

Tabela 6.18. Porcentagem de fragmentação de ADN em linhagens de células de leucemia induzidas por *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) (**4-6**).

Compostos	HL 60	Jurkat
H2Ac4oT	75,39 ± 9,53	19,70 ± 2,16
H2Ac4mT	35,99 ± 8,52	4,68 ± 2,4
H2Ac4pT	75,36 ± 9,55	12,29 ± 1,83
Sb(2Ac4oT)Cl ₂] (4)	25,27 ± 7,28	25,11 ± 1,34
[Sb(2Ac4mT)Cl ₂] (5)	86,87 ± 3,29	20,44 ± 3,14
[Sb(2Ac4pT)Cl ₂] (6)	71,52 ± 6,05	21,45 ± 8,29
Cisplatina	86,05 ± 4,80	6,95 ± 0,92
SbCl ₃	32,17 ± 3,33	3,17 ± 1,73

Células HL-60 e Jurkat foram tratadas com soluções dos compostos (10µM) por 24 horas. Os dados representam pelo menos dois experimentos independentes, feitos em duplicata.

Em células HL-60 as tiossemicarbazonas H2Ac4oT e H2Ac4pT são capazes de induzir 75% de fragmentação de ADN a 10 µM, enquanto H2Ac4mT induz apenas 35%. Com a coordenação ao antimônio(III) o único ligante a ter sua capacidade de fragmentação aumentada foi H2Ac4mT. O complexo [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (**5**) induz cerca de 86% de fragmentação, enquanto que [Sb(2Ac4oT)Cl₂] (**4**) induz menor fragmentação que seu ligante livre e [Sb(2Ac4pT)Cl₂] (**6**) apresenta um potencial de fragmentação bem próximo a H2Ac4pT. É importante observar que (**5**) apresenta o maior potencial de fragmentação contra células HL-60, valor bem próximo ao da cisplatina.

Todos os compostos testados apresentaram pequena capacidade de indução de fragmentação de ADN em células Jurkat. Os complexos (4-6) apresentam capacidade de induzir fragmentação superior à de seus ligantes livres sugerindo que a coordenação ao antimônio(III) tenha ativado um mecanismo pró-apoptótico nesta linhagem celular.

Já foi observado anteriormente que tiossemicarbazonas tem maior capacidade de induzir fragmentação de ADN em células HL-60 do que em Jurkat²². Estes dados confirmam o perfil de pró-apoptótico das tiossemicarbazonas.

No intuito de investigar mais a fundo o mecanismo de ação dos compostos estudados, foi realizado um teste de ativação de caspases. As caspases são essenciais no mecanismo de morte das células por apoptose. O teste de ativação de caspases foi feito de acordo com procedimento descrito na seção 2.4.3. O teste foi realizado em células HL-60, usando um pan-inibidor de caspases (Z-VAD-FMK). [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5) foi escolhido para realização dos testes pois este foi o único caso em que a coordenação promoveu um aumento na capacidade de fragmentação de ADN.

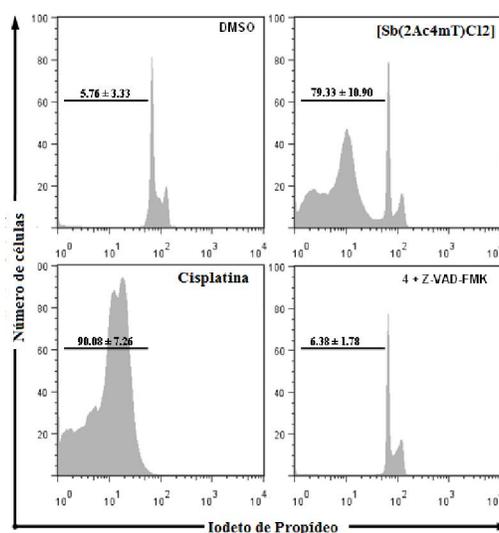


Figura 6.12 - Indução da fragmentação de ADN em células HL-60 causada [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5) após tratamento com Z-VAD-FMK.

Podemos observar na Figura 6.12 que Z-VAD-FMK foi capaz de inibir a fragmentação de ADN induzida por [Sb(2Ac4mT)Cl₂] (5), indicando que o mecanismo de morte celular por apoptose induzido pelo complexo (5) se dá via ativação de caspases.

Com base nos dados apresentados, foi realizado um teste de ativação de caspase-3 (seção 2.4.3), umas das principais caspases que é ativada por fatores intrínsecos e extrínsecos no

²² K. O. S. Ferraz, G. M. M. Cardoso, C. M. Bertollo, E. M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C. L. Zani, I. C. Mendes, M. A. Gomes, H. Beraldo, Polyhedron, 30 (2011) 315-321.

processo apoptótico. Após 12 horas de incubação, $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ (**5**) induziu um aumento de 37% na ativação de caspase-3 (Figura 6.13).

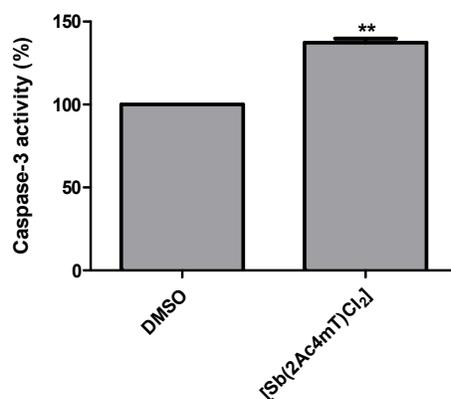


Figura 6.13 - Indução da ativação de caspase-3 em células HL60 causada por $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ 10 μM por 12 horas. Os dados representam três experimentos independentes feitos em triplicata.

Os resultados apresentados demonstram que a atividade de $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ (**5**) é caspase dependente e que este tem mecanismo pró-apoptótico. Investigações recentes demonstraram que tiossemicarbazonas com estrutura semelhante às utilizadas neste estudo agem por mecanismo não-apoptótico enquanto o complexo de paládio(II) exibe perfil pró-apoptótico. Neste contexto, a coordenação ao antimônio(III) no complexo (**5**) poderia ser uma boa estratégia se o complexo exibir um mecanismo de ação diferente daquele da tiossemicarbazona²².

Capítulo 7- Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 8-hidroxiquinolina, 5-cloro-8-hidroxiquinolina e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol)

I. Complexos de bismuto(III) de derivados de 8-hidroxiquinolina

Foram obtidos complexos de bismuto(III) com 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol, HQI) (ver Figura 7.1).

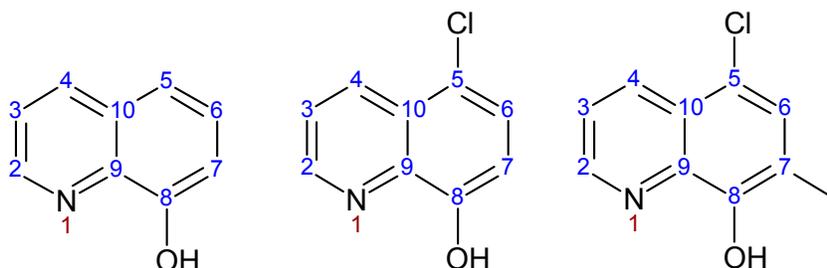


Figura 7.1-Representações estruturais de 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol, HQI).

As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.13. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 7.1) e por seus espectros de infravermelho (Tabela 7.2) e ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 7.3 a 7.4).

Os resultados sugerem a formação de di- μ -oxo[*bis*(8-hidroxiquinolinato) bismuto(III)] [Bi(QN)O]₂.0,25EtOH (1), di- μ -oxo[*bis*(5-cloro-8-hidroxiquinolinato) bismuto(III)] diidratado [Bi(QC)O]₂.2H₂O (2) e [*bis*(5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolinato)dicloro]bismuto(III) tricloridrato, [Bi(QI)₂Cl₂].3HCl (3). A dimerização nos casos dos complexos (2) e (3) foi proposta em razão da facilidade do metal em produzir espécies diméricas e poliméricas, e porque o número de coordenação 3 seria pouco provável. Espectros de massa foram feitos para se comprovar as formulações.

No caso do complexo (1) a presença de 0,25 EtOH foi confirmada pela curva TG (Figura 7.2), que mostra uma perda de massa de 1,6% (teórico: 1,5%) entre 20,71 °C e 54,39 °C. As duas moléculas de água de coordenação no complexo (2) foram confirmadas por meio de sua curva termogravimétrica, que mostrou uma perda de massa de 5,2 % (teórico: 4,8%) entre 230-280 °C.

Tabela 7.1 – Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), fórmula molecular massa molar e condutividade molar dos complexos de bismuto(III) de 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI).

Composto	% C	% H	%N	Fórmula molecular	MM (g.mol ⁻¹)	A _M (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
[Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1)	31,49 (29,64)	1,83 (1,81)	3,84 (3,74)	C ₁₈ H ₁₂ Bi ₂ N ₂ O ₄	749,77	20,15
[Bi(QC)O] ₂ .2H ₂ O (2)	25,43 (25,64)	1,59 (1,67)	3,39 (3,32)	C ₁₈ H ₁₄ Bi ₂ Cl ₂ N ₂ O ₆	843,18	10,90
[Bi(QI) ₂ Cl].3HCl (3)	22,5 (22,45)	1,2 (1,15)	2,9 (2,91)	C ₁₈ H ₁₁ BiCl ₆ I ₂ N ₂ O ₂	962,79	7,27

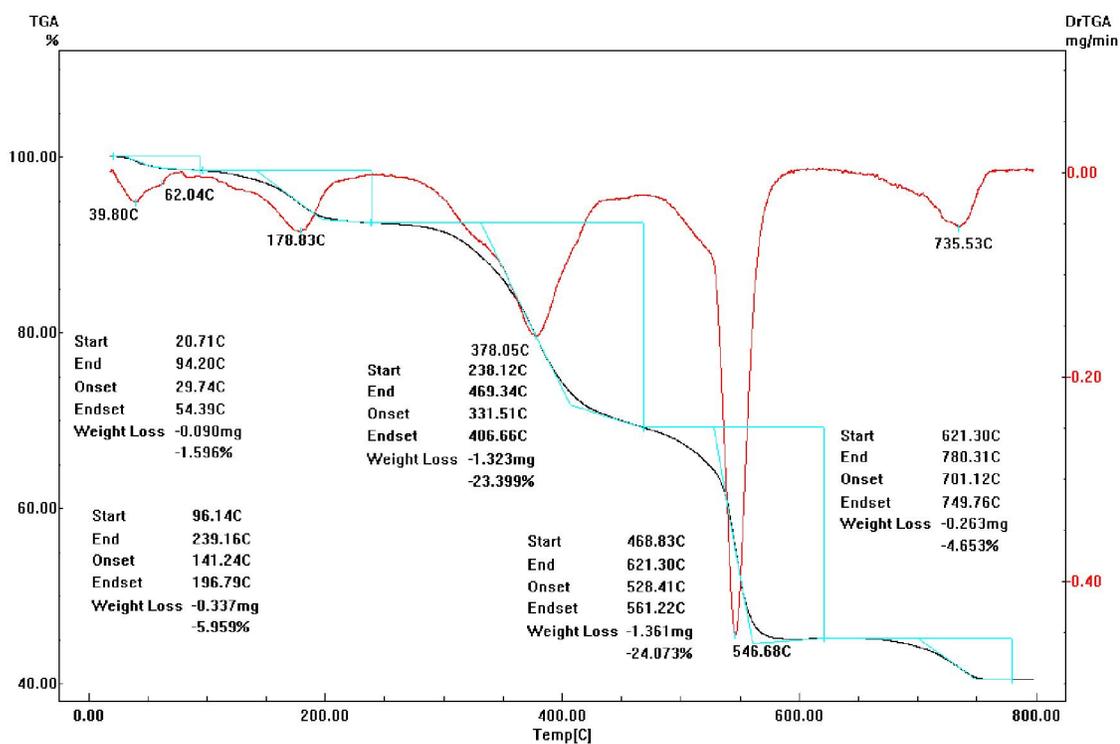


Figura 7.2 - Curva termogravimétrica para o complexo [Bi(QN)O]₂.0,25EtOH (1).

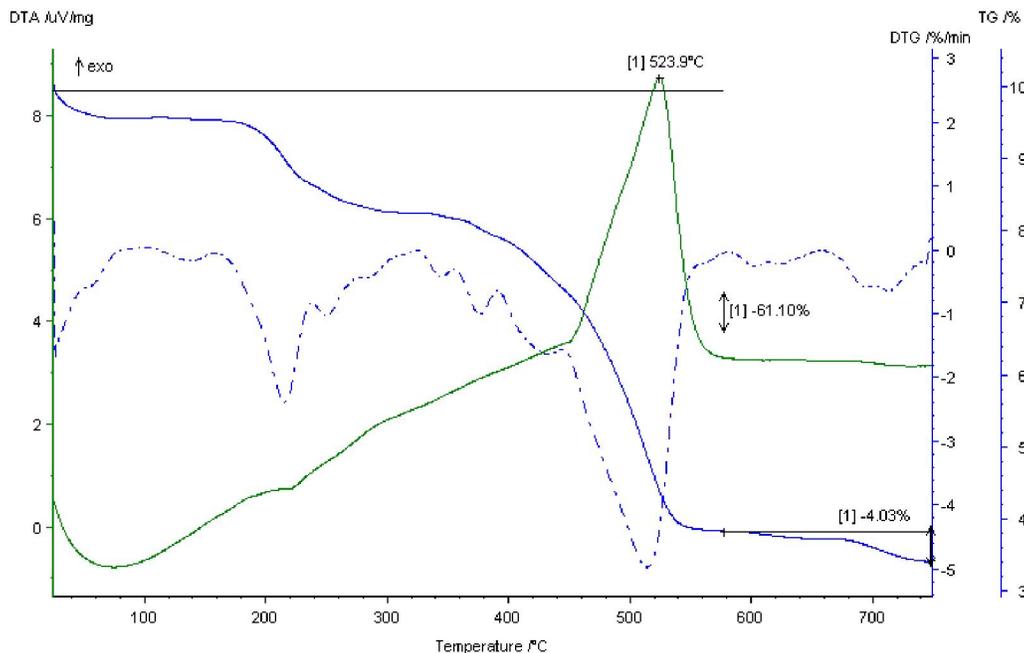


Figura 7.3 - Curva termogravimétrica para o complexo $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2).

As principais bandas nos espectros de infravermelho dos derivados de 8-hidroxiquinolina e seus complexos de bismuto(III) encontram-se na Tabela 7.2. A vibração atribuída a $\nu(\text{C}=\text{N})$, que encontra-se em $1459\text{-}1473\text{ cm}^{-1}$ e a vibração correspondente à deformação do anel da piridina no plano, situada em $616\text{-}637\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das quinolinas livres deslocam-se para $1430\text{-}1496\text{ cm}^{-1}$ e $606\text{-}634\text{ cm}^{-1}$ respectivamente nos espectros dos complexos, indicando o envolvimento do nitrogênio heteroaromático na coordenação¹. A vibração $\nu(\text{C}-\text{O})$, observada em $1200\text{-}1223\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das bases livres, desloca-se para $1208\text{-}1235\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação ao oxigênio².

Novas absorções em $276\text{-}280\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Bi}-\text{N}_{\text{py}})$. Nos espectros de (1) e (2) as novas bandas em $540\text{-}570\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a $\nu(\text{Bi}-\text{O})$, enquanto que no espectro de (3) a banda em 248 cm^{-1} foi atribuída a $\nu(\text{Bi}-\text{Cl})$. No caso dos complexos (1) e (2) a presença de duas bandas atribuídas à vibração $\nu(\text{Bi}-\text{O})$ é compatível com a formação de um dímero ligado por uma ponte μ -óxido (ver Figura 7.4)³.

¹ C. C. Wagner, S. Calvo, M. H. Torre, E. J. Baran. *J. Raman Spectrosc.* 38 (2007)373–376.

² S. Yurdakul, K. Arýcý J. *Mol. Struct.*, 691 (2004) 45-49.

³ K. Nakamoto *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, second ed., Wiley-Interscience, New York, 1970.

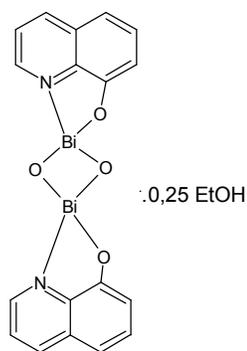


Figura 7.4- Estrutura proposta do complexo $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (**1**).

Tabela 7.2 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de HQN, HQC, HQI e seus complexos $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ (**3**) – suportes: KBr ($4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$); CsI ($400\text{-}200\text{cm}^{-1}$).

Composto	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MNpy})$	$\nu(\text{MO})$	$\nu(\text{MCl})$
HQN	3049lg	1223f	1473F	637F	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (1)	3446lg	1235m	1459m	606f	277f	562f 587f	-
HQC	3193lg	1200F	1468F	634f	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	3150lg	1208f	1496F	615f	276f	540f	-
HQI	3070F	1201F	1459m	616f	-	-	-
$[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ (3)	3099F	1222m	1430F	628f	280f	-	248f

F= forte; m= média; f= fraca; lg=larga

Nos espectro de ^1H RMN dos complexos (**1-3**) a ausência do sinal de OH de em C(8) indica que os ligantes se encontram na forma de enolato. O deslocamento dos sinais dos hidrogênios e carbonos do sistema de anéis condensados em relação às suas posições nas bases livres sugere o envolvimento dos dois sítios de coordenação: o nitrogênio heteroaromático e o oxigênio. A Figura 7.5 apresenta o espectro de ^1H RMN de HQN e do complexo $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (**1**). Os hidrogênios do etanol aparecem na região de baixa frequência.

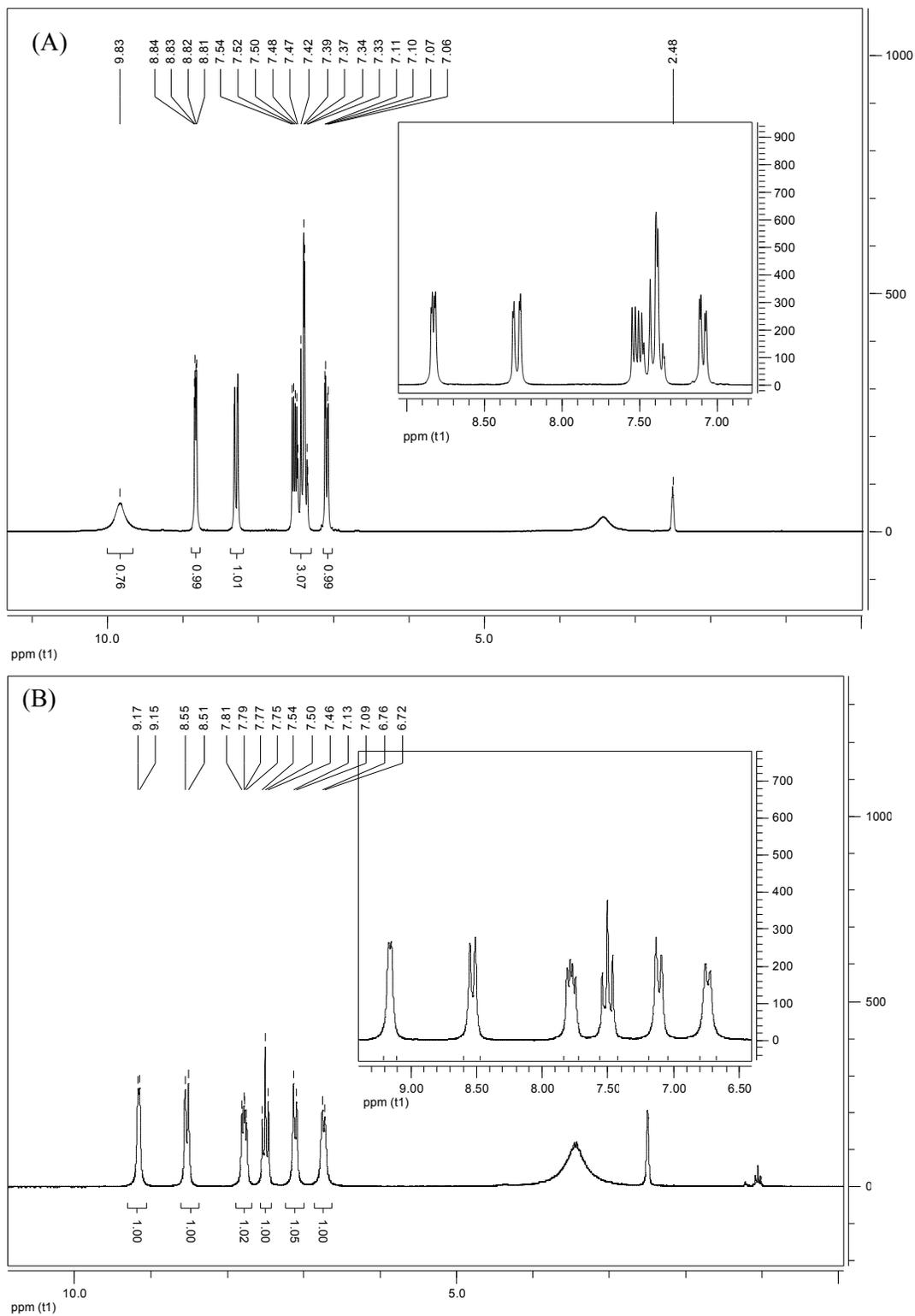


Figura 7.5 – Espectro de ^1H RMN em DMSO-d_6 de a) HQN e b) $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (**1**).

Tabela 7.3 – Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ^1H RMN, ^{13}C de 8-hidroxiquinolina (HQN) e $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (**1**) ($\text{DMSO}-d_6$).

Atribuições	HQN δ (ppm)	$[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (1)	M	Atribuições	HQN δ (ppm)	$[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (1)
H(2)	8,35	9,16	d	C(2)	149,40	146,95
H(3)	7,53	7,77	m	C(3)	123,55	121,80
H(4)	8,30	8,53	d	C(4)	133,00	138,51
H(5)	7,40	7,11	d	C(5)	118,85	114,24
H(6)	7,44	7,50	t	C(6)	128,10	129,57
H(7)	7,10	6,38	d	C(7)	112,10	114,01
C(8)-OH	9,85	-	s	C(8)	153,50	154,95
-	-	-	-	C(9)	138,83	141,99
-	-	-	-	C(10)	126,47	131,19

s=simpleto; d=dupleto,t=tripleto; m=multiplero

Tabela 7.4– Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ^1H RMN, ^{13}C de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**) ($\text{DMSO}-d_6$).

s=simpleto; d=dupleto,t= tripleto; m=multiplero

Atribuições	HQC δ (ppm)	$[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2)	M	Atribuições	HQC δ (ppm)	$[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2)
H(2)	8,93	9,08	d	C(2)	149,40	148,49
H(3)	7,74	6,96	d	C(3)	123,55	123,09
H(4)	8,51	8,57	t	C(4)	133,00	133,68
H(6)	7,63	7,65	d	C(5)	118,85	117,00
H(7)	7,13	6,96	d	C(6)	128,10	123,33
C(8)-OH	10,24	-	s	C(7)	112,10	113,65
-	-	-	-	C(8)	153,50	155,65
-	-	-	-	C(9)	138,83	140,60
-	-	-	-	C(10)	126,47	126,95

Tabela 7.5 – Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ^1H RMN, ^{13}C de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI) e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ (**3**) ($\text{DMSO}-d_6$).

s=simpleto; d=dupleto, m=multiplero, sl=sinal largo

Atribuições	HQI δ (ppm)	$[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$	M	Atribuições	HQI δ (ppm)	$[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$
H(2)	8,94	9,42	d	C(2)	149,55	149,44
H(3)	7,74	8,21	q	C(3)	125,58	123,36
H(4)	8,46	8,93	d	C(4)	132,90	133,20
H(6)	7,97	8,42	s	C(5)	119,32	118,86
C(8)-OH	11,21	-	sl	C(6)	134,85	135,04
-	-	-	s	C(7)	78,86	-
-	-	-	-	C(8)	153,47	206,47
-	-	-	-	C(9)	137,37	137,72
-	-	-	-	C(10)	123,32	125,93

7.1- Análise por difração de raios-X da estrutura cristalográfica de [Bi(QI)₃] (3a)

Por evaporação lenta de uma solução acetona:DMF (9:1) do complexo (3) foram obtidos cristais do complexo [Bi(QI)₃] (3a) cuja estrutura foi determinada por difração de raios-X.

Dados de difração de raios-X foram coletados em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI (LabCri) com detector de CCD, usando radiação MoK α ($\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$). A coleta e o tratamento dos dados foram feitos por meio do pacote de programas CrysAlis⁴. A estrutura foi resolvida por métodos diretos utilizando o programa SHELXS-97⁵ e refinada utilizando o programa SHELXL-97⁶. Os gráficos foram obtidos pelos programas ORTEP^{7,8} e Mercury⁹.

Os dados cristalográficos e os detalhes do refinamento da estrutura de [Bi(QI)₃] (3a) estão descritos na Tabela 7.6 .

Tabela 7.6 - Dados cristalográficos e refinamento da estrutura de [Bi(QI)₃] (3a)

Composto	[Bi(QI) ₃] (3a)
Fórmula empírica	C ₂₇ H ₁₂ Bi Cl ₃ I ₃ N ₃ O ₃
Massa molecular (g mol ⁻¹)	1122,43
Temperatura (K)	150(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P 1 21/c 1
a (Å)	12,321(5)
b (Å)	27,283(5)
c (Å)	17,958(5)
α (°)	90,000(5)
β (°)	102,753(5)
δ (°)	90,000(5)
V (Å ³)	5888(3)
Z	8
Densidade calculada (Mg/m ³)	2,532
Coefficiente de absorção μ (mm ⁻¹)	9,443

⁴ CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK scaling algorithm. CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.

⁵ G. M. Sheldrick, SHELXS-97; Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.

⁶ G. M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany, 1997.

⁷ L. J. Farrugia, WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 837-838.

⁸ L. J. Farrugia; ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), J. Appl. Crystallogr. 30 (1997) 565.

⁹ C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, J. Appl. Cryst. 39 (2006) 453-457.

F(000)	4096
Dimensões do cristal (mm)	0,20 x 0,14 x 0,04
Intervalo de θ ($^\circ$)	2,76 to 26,37
Intervalo hkl	-15 \leq h \leq 15, -34 \leq k \leq 34, -22 \leq l \leq 22
Reflexões medidas/únicas/ R_{int}	112777/ 12029/0,0740
Total de dados em $\theta= 26,37$	99,9
Correção de absorção	analítica ^{4,10}
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F^2
Dados/restrições/parâmetros	12029 / 0 / 721
S (Goodness-of-fit on F^2)	1,022
R (abs/all)	0,0365/ 0,0534
wR (abs/all)	0,0756/ 0,0819
$\Delta\rho$ min/Max ($e \text{ \AA}^{-3}$)	2,658 /-2,465

O arranjo e a numeração dos átomos presentes na unidade assimétrica de **3a** estão apresentados na Figura 7.6 Os parâmetros geométricos da molécula (**3a**) são descritos nas Tabelas 7.7 e 7.8.

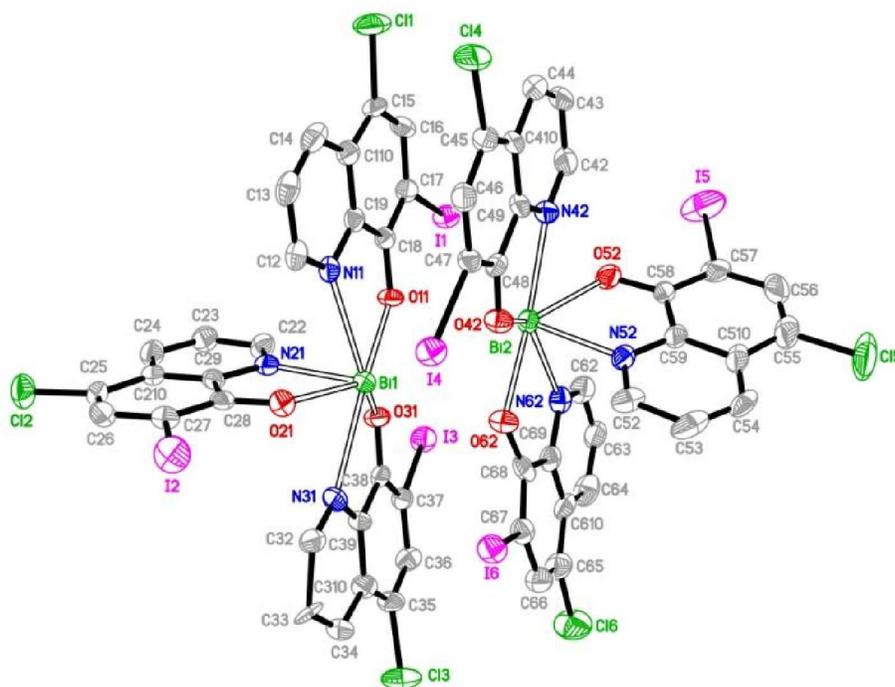


Figura 7.6- Representação ORTEP da unidade assimétrica de $[\text{Bi}(\text{QI})_3]$ (**3a**).

¹⁰ R. C. Clark, J.S. Reid, Acta Cryst. A51(1995) 887-897.

A unidade assimétrica é formada por duas moléculas de $[\text{Bi}(\text{QI})_3]$ (**3a**), Figura 7.6. Três ligantes cloquinol na forma aniônica (QI) encontram-se unidos ao centro metálico através do sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-O}$. O átomo de bismuto(III) está hexacoordenado mas poderia ser considerado como pseudo heptacoordenado. De fato, a distância $\text{Bi}\cdots\text{Bi}$ é de 3,970 Å (Figura 7.7), menor que a soma dos raios de Van der Waals do bismuto(III) (4,8 Å)¹¹. Assim, podemos considerar que existe uma interação de curta distância entre os átomos de bismuto(III) das duas moléculas contidas na célula unitária.

Os comprimentos de ligação Bi-O são diferentes dentro de cada monômero. O comprimento de $\text{Bi}(1)\text{-O}(11)$ é de 2,302(4) Å enquanto que $\text{Bi}(1)\text{-O}(21)$ e $\text{Bi}(1)\text{-O}(31)$ medem 2,312(5) e 2,289(5) Å, respectivamente.

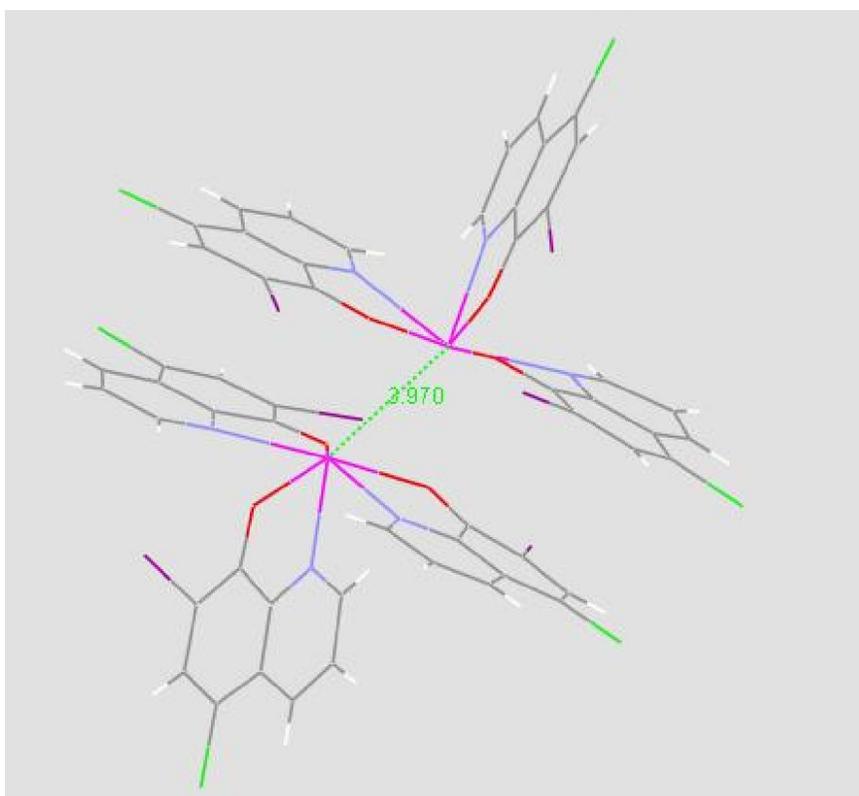


Figura 7.7 - Distância $\text{Bi}\cdots\text{Bi}$ em $[\text{Bi}(\text{QI})_3]$ (**3a**).

¹¹ B. G. Sukhov, S. A. Mukha, I. A. Antipova, S. A. Medvedeva, L. I. Larina, N. N. Chipanina, O. N. Kazheva, G. V. Shilov, O. A. Dyachenko, B. A. Trofimova, *Arkivoc* (2008) 139-149.

Tabela 7.7 – Principais distâncias (Å), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas na estrutura de [Bi(QI)₃] (**3a**)

Átomos [Bi(QI) ₃] (3a)	Comprimento de ligação (Å)	Átomos [Bi(QI) ₃] (3a)	Comprimento de ligação (Å)
Bi(1)-O(31)	2,289(5)	Bi(2)-O(62)	2,288(5)
Bi(1)-O(11)	2,302(4)	Bi(2)-O(42)	2,303(5)
Bi(1)-O(21)	2,312(5)	Bi(2)-O(52)	2,310(5)
Bi(1)-N(21)	2,333(6)	Bi(2)-N(52)	2,328(6)
Bi(1)-N(31)	2,540(6)	Bi(2)-N(62)	2,555(6)
Bi(1)-N(11)	2,612(6)	Bi(2)-N(42)	2,576(6)

Tabela 7.8 – Principais ângulos de ligação (°), com respectivos desvios padrão entre parêntesis, observadas na estrutura de [Bi(QI)₃] (**3a**)

Átomos [Bi(QI) ₃] (3a)	Ângulo de ligação (°)	Átomos [Bi(QI) ₃] (3a)	Ângulo de ligação (°)
O(31)-Bi(1)-O(11)	72,68(16)	O(62)-Bi(2)-O(42)	70,39(16)
O(31)-Bi(1)-O(21)	130,55(16)	O(62)-Bi(2)-O(52)	135,02(17)
O(11)-Bi(1)-O(21)	134,62(16)	O(42)-Bi(2)-O(52)	132,31(18)
O(31)-Bi(1)-N(21)	76,35(18)	O(62)-Bi(2)-N(52)	77,37(19)
O(11)-Bi(1)-N(21)	81,62(18)	O(42)-Bi(2)-N(52)	81,76(19)
O(21)-Bi(1)-N(21)	70,80(18)	O(52)-Bi(2)-N(52)	70,7(2)
O(31)-Bi(1)-N(31)	67,69(18)	O(62)-Bi(2)-N(62)	67,67(17)
O(11)-Bi(1)-N(31)	139,99(17)	O(42)-Bi(2)-N(62)	136,39(17)
O(21)-Bi(1)-N(31)	72,98(18)	O(52)-Bi(2)-N(62)	75,29(19)
O(31)-Bi(1)-N(11)	134,11(16)	N(52)-Bi(2)-N(62)	78,08(19)
O(11)-Bi(1)-N(11)	66,62(16)	O(62)-Bi(2)-N(42)	137,03(18)
O(21)-Bi(1)-N(11)	72,61(17)	O(42)-Bi(2)-N(42)	67,27(17)
N(21)-Bi(1)-N(11)	77,63(18)	O(52)-Bi(2)-N(42)	74,22(19)
N(31)-Bi(1)-N(11)	144,72(18)	N(52)-Bi(2)-N(42)	89,58(19)
C(12)-N(11)-C(19)	118,6(6)	N(62)-Bi(2)-N(42)	149,41(19)
C(12)-N(11)-Bi(1)	128,3(5)	C(48)-O(42)-Bi(2)	121,7(4)
C(19)-N(11)-Bi(1)	112,6(4)	C(58)-O(52)-Bi(2)	117,4(5)
C(22)-N(21)-C(29)	120,9(6)	C(68)-O(62)-Bi(2)	121,2(4)
C(22)-N(21)-Bi(1)	123,7(5)	C(42)-N(42)-C(49)	119,4(7)
C(29)-N(21)-Bi(1)	115,4(4)	C(42)-N(42)-Bi(2)	126,3(6)
C(32)-N(31)-C(39)	119,4(6)	C(49)-N(42)-Bi(2)	112,8(4)

C(32)-N(31)-Bi(1)	127,3(5)	C(52)-N(52)-C(59)	121,0(7)
C(39)-N(31)-Bi(1)	111,2(4)	C(52)-N(52)-Bi(2)	122,6(5)
C(110)-C(15)-Cl(1)	118,7(5)	C(59)-N(52)-Bi(2)	116,3(5)
C(15)-C(16)-C(17)	119,8(6)	C(62)-N(62)-C(69)	118,9(7)
C(18)-C(17)-C(16)	123,4(6)	C(62)-N(62)-Bi(2)	128,3(5)
C(18)-C(17)-I(1)	116,6(5)	C(69)-N(62)-Bi(2)	112,8(4)

7.2 - Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de bismuto(III) de derivados de quinolinas

7.2.1- Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de HQN, HQC e HQI e seus complexos de bismuto(III), $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ (**3**) contra bactérias *gram*-positivas (*Staphylococcus aureus*), ATCC 6538, bactérias *gram*-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC 25853 e fungo (*Candida albicans*), ATCC 10231. A determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (seção 2.4.1). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 7.9. O sal de bismuto (BiCl_3) não foi testado devido à sua baixa solubilidade. Tetraciclina e fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 7.9 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para HQN, HQC, HQI e seus complexos de bismuto(III) (**1-3**)

Composto	CIM (μM) <i>S. aureus</i>	CIM (μM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (μM) <i>C. albicans</i>
HQN	14,40	908,46	20,32
HQC	22,16	477,90	13,36
HQI	27,63	337,55	8,69
$[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ (1)	5,41	75,02	4,11
$[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2)	4,96	63,32	28,66
$[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ (3)	8,62	113,12	2,79
BiCl_3	-	-	-
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Os valores de CIM sugerem que os compostos testados são mais ativos contra a bactéria *gram*-positiva (*S. aureus*) do que contra a bactéria *gram*-negativa (*P. aeruginosa*). Entre os ligantes livres HQN foi o mais ativo contra *S. aureus* e HQI o mais ativo contra *P. aeruginosa*.

A coordenação ao bismuto(III) fez aumentar a atividade antibacteriana nos dois os casos. Apesar de os complexos serem mais eficientes contra *S. aureus*, a melhora da atividade com a complexação é mais pronunciada na ação contra *P. aeruginosa*, onde os complexos se mostraram de três a vinte e cinco vezes mais ativos que seus respectivos ligantes. Vale ainda ressaltar que compostos (**1-3**) apresentam valores de CIM menores que os do composto de referência tetraciclina, contra de *P. aeruginosa*. Assim, neste caso, a complexação ao bismuto(III) se mostra uma estratégia interessante para busca de novos fármacos com ação antibacteriana, principalmente contra bactérias *gram*-negativas.

HQI se mostrou o ligante mais ativo contra *C. albicans* e, dentre os complexos, (**3**) apresentou o menor valor de CIM. Pela coordenação ao bismuto(III) houve aumento na atividade antifúngica nos complexos (**1**) e (**3**) mas não no complexo (**2**). É importante ressaltar que todos os compostos testados se mostraram mais ativos que o fluconazol.

7.2.2 - Avaliação da atividade citotóxica contra células de leucemia humana

Os derivados de quinolina HQN, HQC e HQI e seus complexos de bismuto(III), [Bi(QN)O]₂.0,25EtOH (**1**), [Bi(QC)O]₂.2H₂O (**2**) e [Bi(QI)₂Cl].3H₂O (**3**) foram testadas quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia HL-60 (leucemia promielocítica aguda e Jurkat (leucemia/linfoma de células T do adulto).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Os resultados da avaliação da atividade contra linhagens de célula HL-60 e Jurkat expressos em porcentagem de proliferação celular comparados com o controle (células tratadas com meio de cultura, DMSO 0,1%) são apresentados na Tabela 7.10. Cisplatina, fármaco de referência, foi usado como controle positivo.

Tabela 7.10- Efeito citotóxico (porcentagem de proliferação celular) dos derivados de quinolina HQN, HQC, HQI e de seus complexos de bismuto(III) (**1-3**) em células HL-60 e Jurkat.

Compostos	Jurkat	HL60
HQN	32,86 ± 5,95	90,82 ± 1,52
HQC	54,25 ± 4,27	29,61 ± 9,42
HQI	59,40 ± 1,55	50,70 ± 9,63
[Bi(QN)O] ₂ .0,25EtOH (1)	48,94 ± 7,69	97,33 ± 7,33
[Bi(QC)O] ₂ .2H ₂ O (2)	49,98 ± 7,14	105,70 ± 7,84
[Bi(QI) ₂ Cl].3HCl (3)	57,47 ± 8,29	63,04 ± 13,24
DMSO	100,00 ± 0,00	99,99 ± 0,02
Cisplatina	41,72 ± 1,67	10,22 ± 1,35
BiCl ₃	86,54 ± 7,10	101,32 ± 5,23

Células tratadas com compostos (10 μM). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média de porcentagem de proliferação em comparação ao controle. Dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Em geral os compostos testados apresentam maior porcentagem de inibição contra células Jurkat. Entre os ligantes HQN foi o mais ativo contra células Jurkat e HQC contra células HL-60. A complexação não resultou em maior efeito anti-proliferativo. Por esse motivo, não foram determinados os valores de IC_{50} para os complexos de bismuto(III) estudados.

II. Complexos de antimônio(III) de derivados de 8-hidroxiquinolina

As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito na seção 2.2.14. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutimetria (Tabela 7.11) e por seus espectros de infravermelho (Tabela 7.12) e ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT, e mapas de contorno COSY, HMBC, HMQC (Tabelas 7.13 a 7.15).

Os resultados sugerem a formação de [*bis*(8-hidroxiquinolinato)(cloro)antimônio(III)] [$\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}$] (**4**), [*bis*(5-cloro-8-hidroxiquinolinato)(cloro)antimônio(III)], [$\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}$].EtOH (**5**) e [*bis*(5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolinato)(cloro)antimônio(III)], [$\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}$] (**6**).

Tabela 7.11 – Análise elementar (valores teóricos em parêntesis), massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio (III) de 8-hidroxiquinolina(HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina(HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI)

Composto	% C	% H	%N	MM (g mol^{-1})	Fórmula Molecular	A_M ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{ mol}^{-1}$)
$[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4)	47,91 (48,53)	2,70 (2,71)	6,06 (6,29)	445,51	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{Sb}$	23,32
$[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}] \cdot \text{EtOH}$ (5)	43,57 (43,23)	2,57 (3,28)	5,71 (4,80)	560,47	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{3,5}\text{Sb}$	30,36
$[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6)	28,21 (28,22)	1,08 (1,05)	3,80 (3,66)	766,19	$\text{C}_{18}\text{H}_8\text{Cl}_3\text{I}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Sb}$	97,14

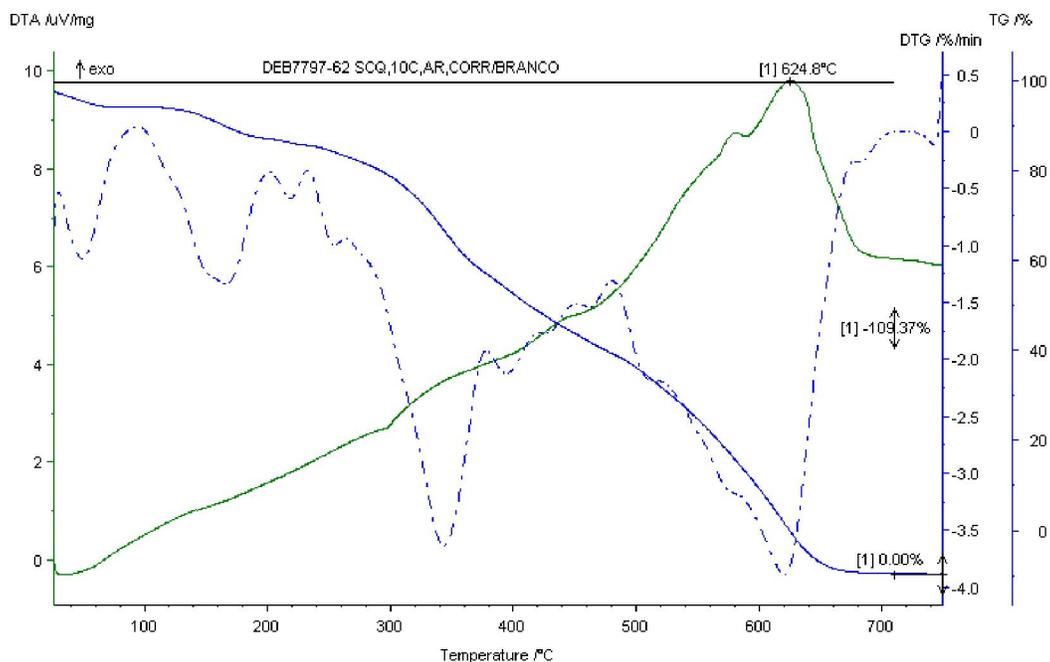


Figura 7.8 - Curva termogravimétrica para o complexo $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (**5**).

No caso do complexo (**5**), a presença de 1 molécula de EtOH foi confirmada pela curva TG (Figura 7.8), que mostra uma perda de massa de 7,50% (teórico: 7,89 %) entre 30-76 °C.

As principais bandas nos espectros de infravermelho das quinolinas e seus complexos de antimônio(III) encontram-se na Tabela 7.12. As vibrações atribuídas a $\nu(\text{C}=\text{N})$ e $\rho(\text{py})$ se encontram em $1587\text{-}1604\text{ cm}^{-1}$ e $636\text{-}647\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das bases livres e se deslocam para $1546\text{-}1566\text{ cm}^{-1}$ e $575\text{-}634\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, nos espectros dos complexos (**4-6**), sugerindo a coordenação ao nitrogênio¹. A absorção referente a $\nu(\text{C}-\text{O})$ observada em $1059\text{-}1084\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das quinolinas se desloca para $1085\text{-}1097\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a participação do átomo de oxigênio na coordenação². As novas bandas observadas em $277\text{-}280\text{ cm}^{-1}$ e $522\text{-}570\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de **4-6** foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Sb}-\text{N}_{\text{py}})$ e $\nu(\text{Sb}-\text{O})$, respectivamente, e as absorções em $232\text{-}243\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas à vibração, $\nu(\text{Sb}-\text{Cl})$ ¹².

¹² H. D. Yin, J. Zhai, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 339-345.

Tabela 7.12 – Bandas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) e seus complexos $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (**4**), $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (**5**) e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (**6**) – suportes: KBr ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$); CsI ($400\text{-}200\text{ cm}^{-1}$)

Composto	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MNpy})$	$\nu(\text{MO})$	$\nu(\text{MCl})$
HQN	3067lg	1059F	1593F	575F	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$ (4)	-	1098F	1552m	626m	277f	522f	243f
HQC	3070lg	1072F	1587F	634f	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (5)	-	1085m	1546F	647m	277f	542f	236f
HQI	3070F	1084F	1604m	616f	-	-	-
$[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (6)	-	1097m	1566m	647m	280f	570f	232f

F= forte; m= média; f= fraca

Os espectros de RMN de 8-hidroxiquinolina (HQN) e de 5-Cl-8-hidroxiquinolina (HQC) foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$. Já o espectro de 5-Cl-7-iodo-8-hidroxiquinoline (HQI) foi obtido em $\text{DMF-}d_7$, pois o complexo $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ (**6**) é mais solúvel neste solvente do que em DMSO . Os espectros de (**4**) e (**5**) também foram feitos em $\text{DMSO-}d_6$.

Os espectros de ^1H RMN dos complexos (**4-6**) não apresentam sinal referente ao hidrogênio C(8)-OH, sugerindo que as quinolinas estariam coordenadas de forma aniônica. No espectro de ^{13}C NMR os sinais dos carbonos da piridina e do anel fenólico sofrem deslocamentos significativos, o que está de acordo com a coordenação pelo nitrogênio de piridina e do oxigênio do anel fenólico.

A Figura 7.9 apresenta os espectros de ^1H RMN de HQC e do complexo $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}]\cdot\text{EtOH}$ (**5**). Os hidrogênios do etanol aparecem na região de baixa frequência.

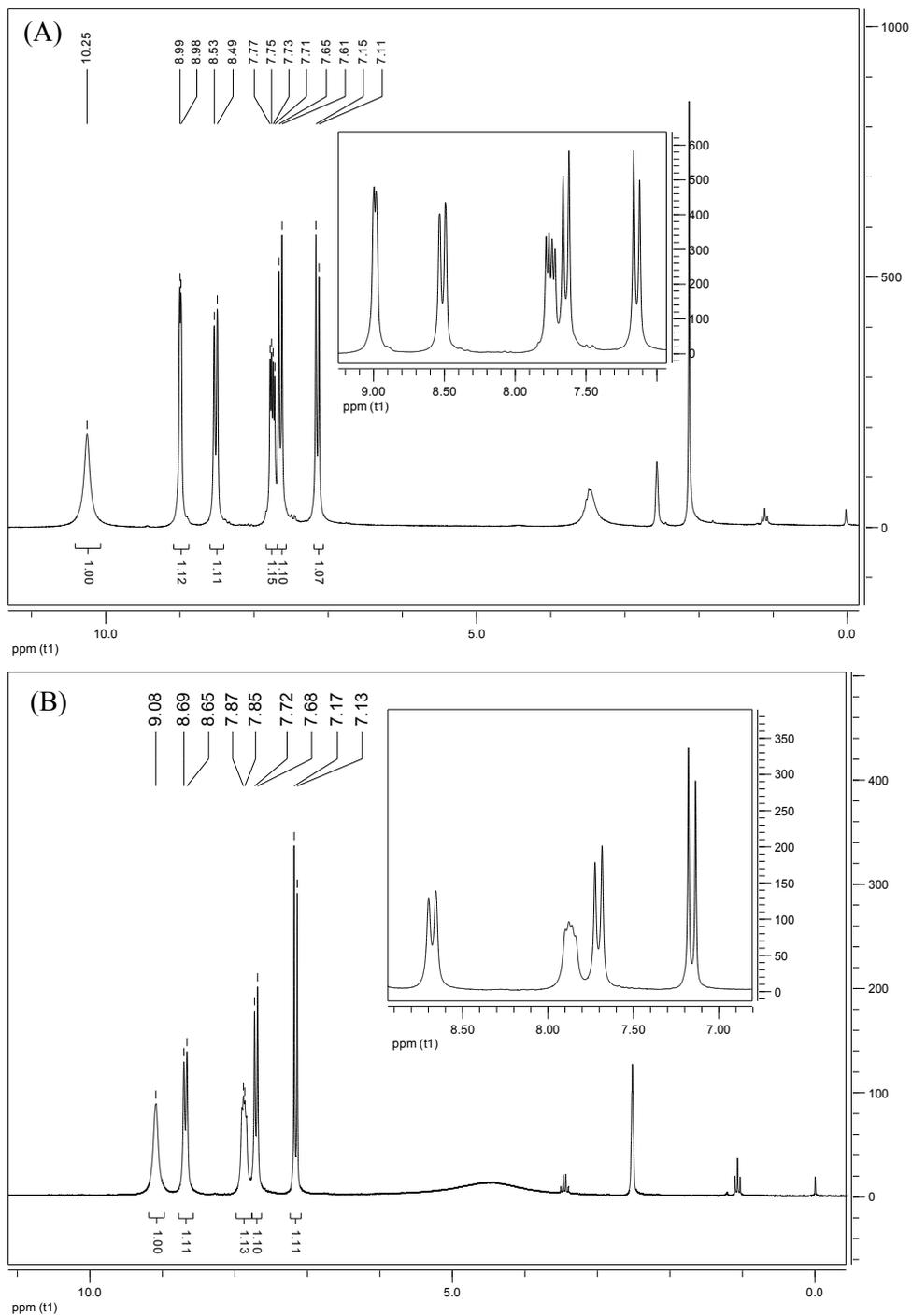


Figura 7.9 - Espectro de 1H RMN ($DMSO-d_6$) de a) HQC e b) $[Sb(QN)_2Cl].EtOH$ (5).

Tabela 7.13– Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ¹H RMN, ¹³C de 8-hidroxiquinolina (HQN) e [Sb(QN)₂Cl] (4) (DMSO-d₆).

Atribuições	HQN δ (ppm)	[Sb(QN) ₂ Cl]	M	Atribuições	HQN δ (ppm)	[Sb(QN) ₂ Cl]
H(2)	8,35	9,09	s	C(2)	149,40	146,71
H(3)	7,53	7,81	m	C(3)	123,55	122,25
H(4)	8,30	8,70	d	C(4)	133,00	140,40
H(5)	7,40	7,48	d	C(5)	118,85	117,58
H(6)	7,44	7,61	t	C(6)	128,10	129,37
H(7)	7,10	7,19	d	C(7)	112,10	113,99
C(8)-OH	9,85	-	s	C(8)	153,50	n.o.
-	-	-	-	C(9)	138,83	n.o.
-	-	-	-	C(10)	126,47	n.o.

s=simpleto; d=dupleto, m=multipleto; n.o. = não observado

Tabela 7.14 –Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ¹H RMN, ¹³C de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e [Sb(QC)₂Cl].EtOH (5) (DMSO-d₆).

Atribuições	HQC δ (ppm)	[Sb(QC) ₂ Cl].EtOH	M	Atribuições	HQC δ (ppm)	[Sb(QC) ₂ Cl].EtOH
H(2)	8,93	9,08	s	C(2)	149,40	147,33
H(3)	7,74	7,86	m	C(3)	123,55	123,43
H(4)	8,51	8,67	d	C(4)	133,00	135,01
H(6)	7,63	7,69	d	C(5)	118,85	118,10
H(7)	7,13	7,15	d	C(6)	128,10	128,49
C(8)-OH	10,24	-	s	C(7)	112,10	113,01
-	-	-	-	C(8)	153,50	152,70
-	-	-	-	C(9)	138,83	137,26
-	-	-	-	C(10)	126,47	126,23

s=simpleto; d=dupleto, m=multipleto

Tabela 7.15– Atribuições, multiplicidade (M) e deslocamentos químicos dos sinais de ¹H RMN, ¹³C de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (HQI) e [Sb(QI)₂Cl] (6) (DMF-d₇).

Atribuições	HQI δ (ppm)	[Sb(QI) ₂ Cl] (6)	M	Atribuições	HQI δ (ppm)	[Sb(QI) ₂ Cl] (6)
H(2)	9,16	9,40	d	C(2)	150,52	147,80
H(3)	7,97	7,96	q	C(3)	124,05	124,16
H(4)	8,72	8,94	d	C(4)	133,63	137,29
H(6)	8,19	N,O,	s	C(5)	120,47	118,39
C(8)-OH	11,19	-	sl	C(6)	135,82	N,O,
-	-	-	s	C(7)	78,08	83,13
-	-	-	-	C(8)	154,69	N,O,
-	-	-	-	C(9)	138,41	N,O,
-	-	-	-	C(10)	126,66	127,67

7.3 – Avaliação da atividade farmacológica dos complexos de antimônio(III) de derivados de quinolinas

7.3.1- Avaliação da atividade antimicrobiana

Como para os compostos de bismuto(III) foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* HQN, HQC e HQI e seus complexos [Sb(QN)₂Cl] (**4**), [Sb(QC)₂Cl].EtOH, (**5**) e [Sb(QI)₂Cl] (**6**) contra *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25853 e *Candida albicans*, ATCC 10231. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 7.16. Tetraciclina e o fluconazol foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 7.16 - Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* para HQN, HQC, HQI e seus complexos [Sb(QN)₂Cl] (**4**), [Sb(QC)₂Cl].EtOH (**5**) e [Sb(QI)₂Cl] (**6**)

Composto	CIM (µM) <i>S. aureus</i>	CIM (µM) <i>P. aeruginosa</i>	CIM (µM) <i>C. albicans</i>
HQN	14,40	908,46	20,32
HQC	22,16	477,90	13,36
HQI	27,63	337,55	8,69
[Sb(QN) ₂ Cl] (4)	4,56	146,82	0,22
[Sb(QC) ₂ Cl].EtOH (5)	11,70	109,64	4,37
[Sb(QI) ₂ Cl] (6)	11,12	77,49	3,43
SbCl ₃	2297,76	754,35	406,25
Tetraciclina	0,69	169,20	-
Fluconazol	-	-	111,22

Como já mencionado, os valores de CIM sugerem que os compostos testados são mais ativos contra bactéria *gram*-positiva (*S. aureus*) do que contra a bactéria *gram*-negativa (*P. aeruginosa*). Dentre os ligantes livres HQN foi o mais ativo contra *S. aureus* e HQI o mais ativo contra *P. aeruginosa*. A coordenação ao antimônio(III) melhorou a atividade antibacteriana em todos os casos. Dentre os complexos o mais ativo contra *S. aureus* foi o complexo (**4**) e o complexo (**6**) apresentou menor valor de CIM contra *P. aeruginosa*. A exemplo dos complexos de bismuto(III) discutidos anteriormente, os complexos de antimônio(III) são mais eficientes contra *S. aureus*. No entanto, o efeito da coordenação sobre a atividade contra *P. aeruginosa* foi mais pronunciado.

HQI se mostrou o ligante mais ativo contra *C. albicans* e entre os complexos (**4**) apresentou o melhor resultado, com valor de CIM na casa de nanomolar. A complexação fez aumentar a atividade antifúngica em todos os casos. É importante ressaltar que todos os

compostos testados se mostraram mais ativos que o fluconazol. Uma vez que $SbCl_3$ não apresenta atividade significativa em relação aos demais compostos testados, podemos sugerir que a atividade se deve ao complexo como uma entidade química e não ao sal de antimônio.

7.3.2- Avaliação da atividade citotóxica contra células de leucemia humana

Complexos de antimônio(III), $[Sb(QN)_2Cl]$ (**4**), $[Sb(QC)_2Cl].EtOH$ (**5**) e $[Sb(QI)_2Cl]$ (**6**) foram igualmente testados quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia, HL-60 e Jurkat.

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 2.4.3. Os valores de IC_{50} são apresentados na Tabela 7.17. Cisplatina, fármaco de referência foi usado como controle positivo.

Tabela 7.17 - Atividade citotóxica (IC_{50}) dos derivados de 8-hidroxiquinolina e seus complexos $[Sb(QN)_2Cl]$ (**4**), $[Sb(QC)_2Cl].EtOH$ (**5**) e $[Sb(QI)_2Cl]$ (**6**) contra linhagens de célula HL-60 e Jurkat.

Composto	HL 60 (μM)	Jurkat (μM)
HQN	$8,84 \pm 1,73$	$23,37 \pm 1,59$
HQC	$4,88 \pm 0,04$	$14,88 \pm 0,31$
HQI	$15,80 \pm 0,86$	$10,07 \pm 1,13$
$[Sb(QN)_2Cl].EtOH$ (4)	$4,95 \pm 2,55$	$2,34 \pm 0,89$
$[Sb(QC)_2Cl]$ (5)	$3,46 \pm 1,66$	$5,85 \pm 0,99$
$[Sb(QI)_2Cl]$ (6)	$6,37 \pm 1,69$	$6,63 \pm 2,29$
Cisplatina	$0,74 \pm 0,16$	$1,36 \pm 0,69$
$SbCl_3$	$1,84 \pm 1,11$	>100

Os dados representam pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata.

Os complexos (**4**) e (**6**) mostraram-se cerca de duas vezes mais ativos que seus respectivos ligantes contra células HL-60. No entanto é preciso levar-se em conta que em todos os complexos há dois ligantes por átomo metálico. No caso de HQC a coordenação ao antimônio(III) não promoveu melhora na atividade. Interessante observar que o sal de partida $SbCl_3$ apresenta citotoxicidade contra células HL-60, mas não contra células Jurkat. Sendo assim, no caso das células HL-60, não podemos afirmar que a atividade dos complexos (**4-6**) se deve ao complexo *per si*.

Contra células Jurkat a ordem de atividade das bases livres foi $HQI > HQC > HQN$, sugerindo que a introdução de um átomo de halogênio na molécula promove aumento na atividade citotóxica. Com a coordenação ao antimônio(III) observou-se aumento na atividade para todos os casos. O complexo $[Sb(QN)_2Cl]$ (**4**) foi dez vezes mais ativo que o ligante livre e

também o que apresentou maior atividade contra Jurkat. Novamente cabe ressaltar que há duas moléculas de ligante por metal nos complexos e desse modo a coordenação teve impacto mais significativo sobre a atividade no complexo (4).

Nenhum dos compostos apresentou atividade melhor que a da cisplatina contra as duas linhagens de célula. No entanto, os compostos aqui estudados revelaram-se interessantes como candidatos a fármacos no tratamento da leucemia, levando-se em consideração o número de pacientes que desenvolvem resistência aos antitumorais de uso clínico.

7.3.3 - Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma Cruzi*

A Tabela 7.18 apresenta os valores de citotoxicidade e os valores de IC₅₀ de inibição do crescimento induzido pelos compostos testados contra formas tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Os testes foram realizados de acordo com procedimento descrito na seção 2.4.4. Curvas dose-resposta foram obtidas para todos os compostos.

Tabela 7.18 - Valores de citotoxicidade e IC₅₀ de HQN, HQC, HQI e seus complexos [Sb(QN)₂Cl] (4), [Sb(QC)₂Cl].EtOH (5) e [Sb(QI)₂Cl] (6) contra formas tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Composto	Citotoxicidade (μM)	IC ₅₀ tripomastigota (μM)	IC ₅₀ epimastigota (μM)
HQN	<6,89	4,47	3,37
HQC	<5,57	3,95	3,28
HQI	<3,27	21,96	2,65
[Sb(QN) ₂ Cl] (4)	<2,24	4,20	1,68
[Sb(QC) ₂ Cl] (5).EtOH	1,72	1,22	0,93
[Sb(QI) ₂ Cl] (6)	<1,30	1,28	0,56
benzonidazol	96,06	6,26	6,65
nifurtímox	3,48	2,75	1,88
SbCl ₃	<4,38	65,75	6,79

Os derivados de 8-hidroxiquinolina inibiram o crescimento das formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*. HQN e HQC mostraram maior atividade contra a forma tripomastigota do que HQI. Entretanto, HQI foi o mais ativo contra a forma epimastigota.

A coordenação ao antimônio(III) promoveu um aumento na atividade de HQC e HQI contra forma tripomastigota, enquanto que a de HQN não sofreu alteração. O efeito da coordenação é mais pronunciado em (6).

Os complexos (4-6) foram mais ativos que os ligantes livres na forma epimastigota. [Sb(QI)₂Cl] (6) foi o composto mais ativo e também o que teve maior aumento na atividade com relação ao base livre.

Infelizmente, todos os compostos exibem citotoxicidade em doses similares ou menores que os valores de IC₅₀. Entretanto, vale ressaltar que o composto usado como referência, nifurtimox, foi menos ativo que [Sb(QI)₂Cl] (**6**) e apresentou efeito citotóxico similar.

O artigo intitulado “Investigation on the pharmacological profile of antimony(III) complexes with hydroxyquinoline derivatives: anti-trypanosomal activity and cytotoxicity against human leukemia cell lines” publicado no periódico *Biometals* (DOI 10.1007/s10534-011-9407-8), apresenta parte dos resultados obtidos neste capítulo. O texto está anexado no final da tese¹³.

¹³ D. C. Reis, M. C. X. Pinto, E. M. Souza-Fagundes, L. F. Rocha, V. R. A. Pereira, C. M. L. Melo, H. Beraldo, *Biometals* (2011), artigo publicado *on-line*.

Capítulo 8 - Discussão e Conclusões

No presente trabalho foram sintetizadas novas tiossemicarbazonas derivadas de imidazol, novos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina, 2-piridinoformamida e 2-acetilpiridina, assim como de derivados de quinolina (8-hidroxiquinolina; 5-cloro-8-hidroxiquinolina e 7-iodo-5-cloro-8-hidroxiquinolina). O perfil farmacológico dos compostos estudados foi investigado por meio de avaliações de suas atividades contra fungos fitopatogênicos e patógenos humanos, bactérias *gram*-positivas *Staphylococcus aureus* e *gram*-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, de suas atividades antiparasitárias contra *Trypanosoma cruzi* e de suas atividades citotóxicas contra células de leucemia humana.

Foram obtidas oito novas tiossemicarbazonas derivadas de imidazol: 4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImT), *N*(5)-fenil-4(5)-imidazol carboxaldeído tiossemicarbazona (ImTPh), 4-(1*H*-imidazol-1-il)benzalaldeído tiossemicarbazona (4ImBzT) e seus derivados *N*(5)-metil (4ImBzTM) e *N*(5)-fenil (4ImBzTPh) substituídos, 4-(1*H*-1-il)acetofenona tiossemicarbazona (4ImAcT) e seus derivados *N*(5)-metil (4ImAcTM) e *N*(5)-fenil (4ImAcTPh) substituídos. As estruturas cristalográficas de ImT, ImTPh, 4ImBzT, 4ImBzTM e 4ImBzTPh foram determinadas por difração de raios-X. ImT e 4ImBzT demonstraram atividade seletiva e bastante significativa contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium cladorporioides*. Os resultados sugerem que tais compostos têm potencial para serem empregados na agricultura, uma vez que não exibem atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas.

Complexos diferentes foram obtidos por meio da reação de BiCl₃ com 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4DH) e seus derivados *N*(4)-metil- (H2Bz4M) e *N*(4)-fenil- (H2Bz4Ph) substituídos: [Bi(H2Bz4DH)O(OH)], [Bi(H2Bz4M)Cl₃] e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂]. Os complexos poderiam existir como os dímeros [Bi(H2Bz4DH)O(OH)]₂, [Bi(H2Bz4M)Cl₃]₂ e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] respectivamente.

As 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas apresentam atividade mais significativa contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* do que contra *Pseudomonas aeruginosa*. Em geral a coordenação ao bismuto(III) resultou em aumento da atividade antimicrobiana contra os três microorganismos. Os complexos [Bi(H2Bz4DH)O(OH)], [Bi(H2Bz4M)Cl₃] e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] mostraram-se mais ativos como antifúngicos do que o composto de referência fluconazol.

Todas as tiossemicarbazonas exibiram um perfil de inibição de proliferação celular de forma dose-dependente tanto em células HL-60 quanto em células Jurkat. Entre as tiossemicarbazonas, H2Bz4DH mostrou ser a mais ativa contra células Jurkat e H2Bz4Ph a mais ativa contra HL-60. A coordenação de H2Bz4DH ao bismuto(III) resultou em um aumento

de três vezes na atividade contra HL-60 no complexo [Bi(H2Bz4DH)O(OH)], [Bi(H2Bz4M)Cl₃] e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂]. O complexo [Bi(H2Bz4M)Cl₃] mostrou-se cem vezes mais ativo que a tiossemicarbazona livre contra células HL-60. O valor de IC₅₀ de [Bi(H2Bz4M)Cl₃] contra HL-60 foi comparável ao da cisplatina e o IC₅₀ de H2BzPh foi menor que o da cisplatina.

A coordenação ao bismuto(III) não resultou em aumento de atividade citotóxica contra células Jurkat em nenhum dos casos.

A reação das 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas com SbCl₃ deu como produtos [Sb(2Bz4DH)Cl₂], [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂]. A estrutura cristalográfica de [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] revela a presença de um íon antimônio(III) ligado à tiossemicarbazona aniônica coordenada de modo tridentado pelo sistema N_{py}-N-S e a dois cloretos. A geometria ao redor do antimônio na molécula é descrita como “pseudo” octaédrica devido ao par de elétrons não ligantes presente na esfera de coordenação.

A coordenação ao antimônio(III) promoveu um aumento na atividade antibacteriana de [Sb(2Bz4DH)Cl₂] e [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O em relação aos seus respectivos ligantes contra as duas cepas de bactérias testadas e fez aumentar em trinta vezes a atividade antifúngica do ligante H2Bz4M. Com exceção de H2Bz4M e do sal de partida SbCl₃, todos os compostos mostraram-se mais ativos que o fluconazol.

A coordenação de H2Bz4DH ao antimônio(III) não resultou em um aumento da atividade citotóxica contra células leucêmicas HL-60 e Jurkat mas a coordenação de H2Bz4M e H2Bz4Ph promoveu um aumento significativo de citotoxicidade contra as duas linhagens celulares. Os complexos [Sb(H2Bz4M)Cl₃].2H₂O e [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] apresentaram efeitos citotóxicos contra células HL-60 em concentrações na ordem de nanomolar e revelaram-se mais citotóxicos do que a cisplatina.

A baixa atividade citotóxica das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio sobre células HL-60.Bcl-XL, HL-60.Bcl2 que expressam proteínas anti-apoptóticas e contra a linhagem HL-60.BcrAbl, que expressa a tirosina quinase BcrAbl, associada à anormalidade cromossômica Filadélfia - um dos genes apoptóticos mais potentes - sugere que o mecanismo de citotoxicidade contra HL-60 seria por apoptose celular.

Com exceção de H2Bz4M, as 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio foram capazes de induzir entre 45-61% de fragmentação de ADN nas células HL-60, mas tiveram pouco efeito nas células Jurkat. Uma vez que os compostos apresentaram efeito citotóxico contra células Jurkat, sem no entanto promover fragmentação de ADN significativa, a citotoxicidade nessa linhagem estaria ocorrendo por um mecanismo não apoptótico.

As tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) mostraram-se ativos contra *Trypanosoma cruzi*. Em alguns casos a coordenação ao antimônio(III) promoveu uma melhora

na atividade. $[\text{Sb}(\text{2Bz4DH})\text{Cl}_2]$ demonstrou ser o composto mais ativo contra a forma tripomastigota e $[\text{Sb}(\text{H2Bz4M})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o mais ativo contra a forma epimastigota. Os complexos de antimônio(III) foram mais ativos que o fármaco de referência nifurtimox, porém apresentam citotoxicidade também superior. Embora a coordenação tenha se revelado uma estratégia eficiente para aumentar a atividade os compostos estudados não se mostraram bons candidatos a fármacos devido à sua citotoxicidade elevada.

A reação de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e de seus derivados *N*(4)-metil- (H2Am4M) e *N*(4)-fenil- (H2Am4PH) substituídos com BiCl_3 resultou na formação de $[\text{Bi}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$, $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$, $[\text{Bi}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

As tiossemicarbazonas foram mais ativas contra *C. albicans* e os complexos foram mais ativos contra *S. aureus*. De forma geral a coordenação ao bismuto(III) promoveu aumento na atividade contra todos os microorganismos testados. Os complexos $[\text{Bi}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Bi}_2(\text{H2Am4M})(\text{2Am4M})\text{Cl}_5]$ mostraram ser mais ativos contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* do que os fármacos de referência tetraciclina e fluconazol.

As tiossemicarbazonas exibiram capacidade de inibir o crescimento de células de leucemia humana HL-60 e Jurkat, mas foram mais ativas contra HL-60. H2Am4DH é a tiossemicarbazona mais ativa contra HL-60 e H2Am4Ph é mais ativa contra células Jurkat. A coordenação a bismuto(III) promoveu melhora na atividade contra HL-60, mas não contra Jurkat.

A reação das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas com SbCl_3 deu como produtos: $[\text{Sb}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{2Am4M})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$ e $[\text{Sb}_2(\text{2Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$. O composto $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$ mostra o ligante ciclizado (4-fenil-5-piridino-2-il-4*H*-1,2,4-triazol-3-tiol). Para o composto $[\text{Sb}_2(\text{2Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ as análises sugerem a presença de um cátion $[\text{Sb}_2(\text{2Am4Ph})_2\text{Cl}_3]$ e um ânion $[\text{SbCl}_4]$. No cátion haveria uma ponte de cloreto conectando os dois íons antimônio(III).

A coordenação ao antimônio(III) fez aumentar a atividade das tiossemicarbazonas contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, mas não promoveu melhora significativa contra o fungo *C. albicans*.

Os complexos $[\text{Sb}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}_2(\text{2Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ mostraram-se muito ativos contra células HL60.Bcl- X_L e $[\text{Sb}(\text{2Am4DH})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{2Am4M})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}_2(\text{2Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ revelaram-se muito ativos contra células HL-60 e HL60.Bcr.Abl. Os resultados sugerem que estes ajam através de mecanismos apoptóticos e não-apoptóticos. $[\text{Sb}(\text{H2Triazo4Ph})_2\text{Cl}_3]$ apresentou IC_{50} na ordem de nanomolar contra HL-60 e Jurkat. Uma vez que o ligante ciclizado não apresenta atividade contra ambas as linhagens e que o sal SbCl_3 apresenta atividade significativa apenas contra células HL-60, podemos sugerir que a alta atividade contra células Jurkat se deva ao complexo $[\text{Sb}_2(\text{2Am4Ph})_2\text{Cl}_3][\text{SbCl}_4]$ *per se*.

As tiossemicarbazonas mostraram capacidade de promover entre 40-60% fragmentação de ADN em células HL-60 e 10% em Jurkat. A coordenação ao antimônio(III) fez aumentar a capacidade de fragmentação em células HL-60, com exceção de $[Sb(2Am4DH)Cl_2]$. A capacidade de fragmentação dos complexos contra células Jurkat foi similar às das tiossemicarbazonas livres. Considerando que os compostos apresentaram efeito citotóxico contra células Jurkat sem, no entanto promover fragmentação de ADN significativa, a atividade estaria ocorrendo por um mecanismo não-apoptótico.

A coordenação ao antimônio(III) promoveu uma melhora na atividade contra a forma epimastigota de *T. Cruzi* em todos os casos, sendo $[Sb_2(2Am4Ph)_2Cl_3][SbCl_4]$ o complexo mais ativo. Já contra a forma tripomastigota a melhora com a complexação foi observado somente para $[Sb(2Am4DH)Cl_2]$. No entanto, novamente a citotoxicidade dos compostos é muito alta.

A reação de $BiCl_3$ com *N*(4)-*orto*-toluil- 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4oT), *N*(4)-*meta*-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4mT) e *N*(4)-*para*-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4pT) levou a formação de $[Bi(2Ac4oT)Cl_2]_n$, $[Bi(2Ac4mT)Cl_2]$ e $[Bi(2Ac4pT)Cl_2] \cdot 0,5EtOH$. Estruturas cristalográficas foram determinadas para $[Bi(2Ac4oT)Cl_2]_n$, $[Bi(2Ac4mT)Cl_2DMF]_2$ e $[Bi(2Ac4pT)Cl_2]_n$, obtidos por recristalização em DMF:acetona 1:9.

As estruturas de $[Bi(2Ac4oT)Cl_2]_n$, $[Bi(2Ac4mT)Cl_2DMF]_2$ e $[Bi(2Ac4pT)Cl_2]_n$ são os produtos, diméricos ou poliméricos, formados a partir de monômeros (originalmente pseudo-hexacoordenados ou pseudo-pentacoordenados) que se ligam por meio de pontes de halogênio, resultando em átomos de bismuto heptacoordenados ou hexacoordenados. Em $[Bi(2Ac4mT)Cl_2DMF]_2$ o íon bismuto(III) encontra-se heptacoordenado. Cada unidade monomérica é composta por um centro metálico coordenado de forma tridentada a uma tiossemicarbazona desprotonada, dois íons cloreto e uma molécula de DMF. Com a dimerização observa-se a formação de duas pontes de cloreto que conectam os centros metálicos dos dois monômeros.

A exemplo das outras classe de tiossemicarbazonas estudadas neste trabalho as *N*(4)-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazonas são mais ativas contra *S. aureus* do que contra *P. aeruginosa*. A atividade das tiossemicarbazonas conta *S. aureus* e *P. aeruginosas* segue a seguinte ordem H2Ac4oT<H2Ac4mT<H2Ac4pT. A coordenação ao bismuto(III) levou ao aumento da atividade contra os dois microorganismos. $[Bi(2Ac4oT)Cl_2]$ foi o complexo mais ativo contra *S. aureus* e apresenta valor de CIM quarenta vezes menor que o ligante livre.

É importante ressaltar que o aumento da atividade contra *P. aeruginosa* promovido pela coordenação ao bismuto(III) resultou em um alargamento do espectro de atividades das tiossemicarbazonas, que, complexadas, tornam-se ativas contra a bactéria *gram*-negativa. Os complexos são mais ativos que a tetraciclina usada como referência. Desta forma, os resultados

sugerem que a coordenação ao bismuto(III) é uma estratégia interessante no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos.

A coordenação ao bismuto(III) não levou a um aumento significativo na atividade das tiossemicarbazonas contra o fungo *C. albicans*; no entanto todos os compostos demonstraram atividade superior ao fármaco de controle fluconazol.

A ordem de citotoxicidade contra células HL-60 e Jurkat é $H2Ac4oT > H2Ac4pT > H2Ac4mT$. A coordenação ao bismuto(III) diminui a citotoxicidade contra as duas linhagens em todos os casos, com exceção de $[Bi(2Ac4mT)Cl_2]$ que foi mais ativo que a tiossemicarbazona livre contra células Jurkat. Todas as tiossemicarbazonas apresentam melhor atividade que cisplatina contra ambas as linhagens.

A reação das *N*(4)-toluil-2-acetilpiridinoformamida tiossemicarbazonas com $SbCl_3$ resultou na formação dos complexos $[Sb(2Ac4oT)Cl_2]$, $[Sb(2Ac4mT)Cl_2]$ e $[Sb(2Ac4pT)Cl_2]$.

A atividade antibacteriana das tiossemicarbazonas é maior contra *S. aureus* enquanto os complexos de antimônio(III) são mais ativos contra *P. aeruginosa*. A coordenação não resultou em melhora significativa na atividade das tiossemicarbazonas contra *S. aureus*. As atividades dos complexos contra *P. aeruginosa* foram de duas a nove vezes maiores que as das tiossemicarbazonas correspondentes. $[Sb(2Ac4pT)Cl_2]$ foi o composto mais ativo e mostrou-se mais ativo que a tetraciclina, fármaco de controle.

A coordenação ao antimônio(III) não se revelou uma estratégia interessante para a melhorar a ação antifúngica das tiossemicarbazonas contra *C. albicans*. No entanto todos os compostos, ligantes livres e complexos, apresentaram atividade superior à do fluconazol.

A atividade citotóxica do complexo $[Sb(2Ac4mT)Cl_2]$ é significativamente maior que a tiossemicarbazona livre nas linhagens de células HL-60 e Jurkat e o valor de IC_{50} de $[Sb(2Ac4mT)Cl_2]$ contra HL-60 está na escala de nanomolar. Os complexos $[Sb(2Ac4oT)Cl_2]$ e $[Sb(2Ac4pT)Cl_2]$ não tiveram atividade citotóxica aumentada em relação às tiossemicarbazonas livres contra as duas linhagens de células leucêmicas.

A coordenação ao antimônio(III) resultou em aumento da capacidade de fragmentação do ADN em células HL-60 apenas no complexo $[Sb(2Ac4mT)Cl_2]$, que induziu cerca de 86% de fragmentação, o maior potencial de fragmentação contra células HL-60 entre os compostos testados, com valor próximo ao da cisplatina.

Todos os compostos testados apresentaram pequena capacidade de indução de fragmentação de ADN em células Jurkat. A maior capacidade de induzir fragmentação dos complexos em relação aos ligantes livres sugere que a coordenação ao antimônio(III) tenha ativado um mecanismo pró-apoptótico nesta linhagem celular.

O teste de ativação de caspases realizado em células HL-60 para $[Sb(2Ac4mT)Cl_2]$ mostrou que o *pan*-inibidor Z-VAD-FMK foi capaz de inibir a fragmentação de ADN induzida

por $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$, indicando que o mecanismo de morte celular por apoptose induzido pelo complexo se dá via ativação de caspases. Além disso, o complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ foi capaz de induzir um aumento de 37% na ativação de caspase-3. Com base nesses resultados podemos sugerir que a atividade de $[\text{Sb}(\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]$ é caspase dependente e que este tem mecanismo pró-apoptótico.

A reação de BiCl_3 com 8-hidroxiquinolina (HQN), 5-cloro-8-hidroxiquinolina (HQC) e 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina resultou na formação dos complexos $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$, $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$. A formação de um dímero com ponte μ -oxo nos complexos $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ e $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi sugerida porque o número de coordenação 3 para o íon bismuto(III) seria pouco provável.

A análise por difração de raios-X dos cristais obtidos a partir da solução do complexo $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ revela a formação de $[\text{Bi}(\text{QI})_3]$. É possível que a espécie $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ presente no sólido seja o produto mais reativo (favorecido pela cinética de reação) e $[\text{Bi}(\text{QI})_3]$ seja a espécie favorecida termodinamicamente. A unidade assimétrica é formada por duas moléculas de $[\text{Bi}(\text{QI})_3]$. Três ligantes clioquinol na forma aniônica (QI) encontram-se unidos ao centro metálico através do sistema Npy-O. O átomo de bismuto(III) está hexacoordenado mas poderia ser considerado como pseudo heptacoordenado pela interação entre dois centros de bismuto.

A atividade antibacteriana de HQN, HQC, HQI e de seus complexos de bismuto(III) é maior contra *S. aureus* do que contra *P. aeruginosa*. HQN foi o mais ativo contra *S. aureus* e HQI o mais ativo contra *P. aeruginosa*. A coordenação ao bismuto(III) fez aumentar a atividade antibacteriana nos dois os casos. O efeito da coordenação ao bismuto(III) na atividade é mais pronunciada contra *P. aeruginosa*. $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ mostraram-se mais ativos contra *P. aeruginosa* que a tetracina, o que faz da coordenação de HQC e HQI ao bismuto(III) uma estratégia interessante para busca de novos fármacos com ação antibacteriana, principalmente contra bactérias gram-negativas.

HQC se mostrou o ligante mais ativo contra *C. albicans* e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ o complexo com maior potencial antifúngico. A coordenação ao bismuto(III) levou ao aumento da atividade em $[\text{Bi}(\text{QN})\text{O}]_2 \cdot 0,25\text{EtOH}$ e $[\text{Bi}(\text{QI})_2\text{Cl}] \cdot 3\text{HCl}$ mas não no complexo $[\text{Bi}(\text{QC})\text{O}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. É importante ressaltar que todos os compostos testados se mostraram mais ativos que o fluconazol.

De forma geral HQN, HQC e HQI apresentam baixa atividade anti-proliferativa contra células de leucemia humana HL-60 e Jurkat. De forma geral, a atividade foi maior em células Jurkat. A coordenação ao bismuto(III) não resultou em aumento da atividade.

Os complexos $[\text{Sb}(\text{QN})_2\text{Cl}]$, $[\text{Sb}(\text{QC})_2\text{Cl}] \cdot \text{EtOH}$ e $[\text{Sb}(\text{QI})_2\text{Cl}]$ foram obtidos da reação dos derivados de quinolina com SbCl_3 .

De modo geral a coordenação ao antimônio(III) resultou em aumento da atividade antimicrobiana dos derivados de quinolina contra os três micro-organismos testados [Sb(QN)₂Cl] foi o complexo mais ativo contra *S. aureus* e [Sb(QI)₂Cl] o mais ativo contra *P. aeruginosa*. Assim como no caso do bismuto(III), de modo geral os complexos de antimônio(III) apresentam maior atividade contra *S. aureus* mas o efeito da complexação sobre a atividade foi mais pronunciado contra *P. aeruginosa*.

Os complexos [Sb(QN)₂Cl] e [Sb(QC)₂Cl].EtOH se mostraram mais ativos contra *C. albicans* que os seus ligantes livres. [Sb(QN)₂Cl].EtOH foi o composto mais ativo, com valor de CIM na casa de nanomolar. Os complexos testados foram mais ativos que o fluconazol. É importante ressaltar que o sal SbCl₃ não apresenta atividade antifúngica significativa, e dessa forma podemos sugerir que a atividade se deve ao complexo como uma entidade química e não ao sal de antimônio.

A ordem de citotoxicidade em células leucêmicas foi HQC > HQN > HQI contra células HL-60 e HQI > HQC > HQN contra células Jurkat. De modo geral a coordenação ao antimônio(III) não levou a um aumento significativo da citotoxicidade nas duas linhagens, mas o complexo [Sb(QN)₂Cl] mostrou-se dez vezes mais ativo que o ligante livre contra células Jurkat.

Os derivados de 8-hidroxiquinolina foram capazes de inibir o crescimento das formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*. HQN e HQC foram mais ativos e contra a forma tripomastigota e HQI foi o mais ativo contra a forma epimastigota. Em geral a coordenação ao antimônio(III) promoveu um aumento na atividade, mas todos os compostos exibem citotoxicidade em doses similares ou menores que seus valores de IC₅₀. Vale ressaltar que o composto usado como referência, nifurtimox, foi menos ativo que [Sb(QI)₂Cl] e apresentou efeito citotóxico similar.

De modo geral pode-se dizer que a coordenação das três famílias de tiossemicarbazonas ao bismuto(III) levou a um aumento de suas atividades antibacteriana e antifúngica. A coordenação ao antimônio(III) resultou em melhora de atividade antibacteriana em alguns casos mas não fez melhorar a atividade antifúngica.

A complexação das tiossemicarbazonas estudadas ao antimônio(III) levou a um aumento de sua ação anti-tripanosoma. No entanto a elevada citotoxicidade tanto dos ligantes livre quanto dos complexos exclui a possibilidade de que esses compostos se tornem candidatos a fármacos antichagásicos.

Todas as famílias de tiossemicarbazonas estudadas mostraram-se citotóxicas frente às linhagens de células leucêmicas. A coordenação ao bismuto(III) resultou em aumento de citotoxicidade contra células HL-60 no caso de 2-benzoilpiridina- e 2-piridinoformada tiossemicarbazonas. A coordenação dessas tiossemicarbazonas ao antimônio(III) resultou em

aumento de atividade contra células HL-60 e Jurkat. No caso da *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, que são as mais ativas, a coordenação ao bismuto(III) e ao antimônio(III) resultou em melhora de atividade em complexos isolados.

Em geral as três famílias de tiossemicarbazonas exercem sua atividade citotóxica em células HL-60 por meio de mecanismos que envolvem apoptose celular e em células Jurkat por processos não apoptóticos. Em alguns casos a coordenação ao antimônio(III) resultou em ativação de processos apoptóticos em células Jurkat. Um dos complexos de antimônio(III), mostrou-se efetivo na ativação de caspases. Estamos no momento investigando se os ligantes teriam também tal habilidade. Se não se demonstrarem efetivos na ativação de caspases, teremos mecanismos diferentes para ligantes e complexos, ou seja, duas alternativas diferentes para novos candidatos a fármacos antitumorais.

Com relação aos derivados de quinolinas, os resultados aqui apresentados sugerem que em muitos casos a coordenação ao bismuto(III) e ao antimônio(III) resultou em melhora da atividade antimicrobiana. A coordenação ao antimônio(III) resultou igualmente em melhora da atividade antitripanossoma, mas, novamente, a citotoxicidade dos compostos não permite considera-los para estudos futuros.

A coordenação dos derivados de quinolina ao bismuto(III) não resultou em melhora de sua ação citotóxica contra células leucêmicas e a coordenação ao antimônio(III) só resultou em melhora da citotoxicidade em casos isolados.

O presente trabalho representa uma contribuição importante ao estudo de novos candidatos a fármacos e metalofármacos antimicrobianos e antileucêmicos.

Anexos



Original article

Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human leukemia cell lines

Débora C. Reis^a, Mauro C.X. Pinto^b, Elaine M. Souza-Fagundes^b, Solange M.S.V. Wardell^c, James L. Wardell^a, Heloisa Beraldo^{a,*}^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil^b Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil^c Departamento de Síntese Orgânica, Farmanguinhos – Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, 21041-250 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2010

Received in revised form

20 May 2010

Accepted 21 May 2010

Available online 26 May 2010

Keywords:

Thiosemicarbazones

Antimony(III) complexes

Cytotoxicity

Leukemia

ABSTRACT

The antimony(III) complexes [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**1**), [Sb(H2Bz4M)Cl₃·2H₂O] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**) were obtained with 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H2Bz4DH) and its *N*(4)-methyl (H2Bz4M) and *N*(4)-phenyl (H2Bz4Ph) derivatives. H2Bz4DH, H2Bz4Ph and complexes (**1–3**) exhibited high cytotoxic activity against HL-60 and Jurkat human leukemia cell lines. When these compounds were tested against HL-60 cells with ectopic expression of BcrAbl, Bcl-2 or Bcl-X_L, which confer resistance to apoptosis against a variety of death-inducing agents, the cytotoxicity was much lower, indicating apoptosis to be part of their mechanism of action. The cytotoxic activity of complexes **2** and **3** against HL-60 and Jurkat cells was significantly higher than that of the corresponding thiosemicarbazones, suggesting coordination to be an interesting strategy of cytotoxic dose reduction.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Thiosemicarbazones and their metal complexes present a wide range of bioactivities as antimicrobial, antitumoral, antiviral and antiprotozoal agents [1]. α (*N*)-heterocyclic thiosemicarbazones have been extensively investigated for their antitumoral activity, which has been attributed to the inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), an essential enzyme involved in the conversion of ribonucleotides into deoxyribonucleotides during DNA syntheses [2–5].

Mammalian RDR is composed of two dissimilar proteins: R1, which contains polythiols and R2, which contains non-heme iron and a free tyrosyl radical. Both the R1 and R2 subunits contribute to the active site of the enzyme. Since thiosemicarbazones are iron chelators, they can destabilize or damage the iron-stabilized tyrosyl free radical and thus inhibit the catalytic function of RDR [6]. The R2 subunit is inhibited by hydroxyurea and 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine[®]). Triapine is 100–1000-fold more potent than HU as inhibitor of the R2 subunit [7].

A variety of thiosemicarbazones and their metal complexes proved to be cytotoxic to leukemia cells [8–10]. 2-benzoylpyridine-

derived thiosemicarbazones exhibit anti-leukemia activity, as shown by other authors [10] and by some of us [11]. Moreover, in previous works we demonstrated that 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) [12], ruthenium(II) [13] and tin(IV) [14] complexes present cytotoxic activity against MCF-7, TK-10 and UACC-62 human tumor cell lines and are able to induce cell death by apoptosis.

The major clinical use of antimony compounds is as a treatment for Leishmaniasis [15–17]. However, the antitumor activity of some antimony compounds has been demonstrated [18,19]. Moreover, antimony(III) compounds are now being proposed as a novel therapy for acute promyelocytic leukemia (APL). Other authors investigated the effects of antimony(III) drugs on glutathione homeostasis, oxidative stress and apoptosis in the THP-1 human leukemia monocyte cells. They demonstrated that THP-1 macrophage cells when treated with antimony(III) exhibited high levels of reactive oxygen species and showed the early signs of apoptosis [20].

Since in many cases coordination proves to be a good strategy for thiosemicarbazones' activity improvement, in the present work we prepared antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H2Bz4DH) and its *N*(4)-methyl (H2Bz4M) and *N*(4)-phenyl (H2Bz4Ph) derivatives (Fig. 1).

The studied compounds were evaluated for their *in vitro* anti-proliferative activity against Jurkat (immortalized line of T lymphocyte) and HL-60 (human promyelocytic leukemia). To

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5740; fax: +55 31 3409 5700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

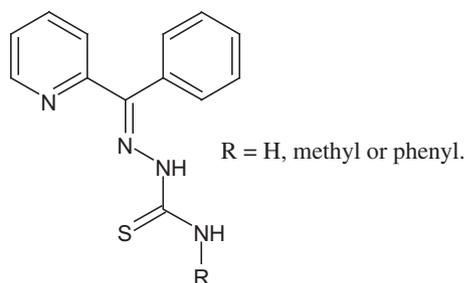


Fig. 1. Generic representation for 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones.

investigate drug sensitivity and resistance, we simulated cell resistance behavior using the lineages HL-60.Bcl2, HL-60.Bcl-X_L and HL-60.BcrAbl. The anti-apoptotic proteins Bcl2 and Bcl-X_L are often over-expressed in various human cancers. The stable expression of these proteins in HL-60 cells converted this apoptosis-sensitive line into resistant cells [21,22]. Inhibition of BcrAbl tyrosine kinase activity has shown to be essential for the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML). A significant proportion of patients chronically treated with antitumoral drugs develop resistance. Hence it is desirable to develop new types of Abl tyrosine kinase inhibitors that may overcome this drug resistance problem. Therefore, screening cytotoxic activity against these cells constitutes an interesting strategy in the discovery of new anticancer drug candidates [23].

2. Results and discussion

2.1. Formation of the antimony(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**1**), [Sb(H2Bz4M)Cl₃]·2H₂O (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**). In **1** and **3** an anionic thiosemicarbazone is attached to the metal center together with two chloride ions while in **2** the metal center is coordinated by a neutral thiosemicarbazone and three chloride ions. In complex (**2**) two crystallization water molecules are also present, as confirmed by its thermogravimetric curve which shows a weight loss of 6.9% (calcd. 7.2%).

2.2. Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{N})$ at 1600–1585 cm⁻¹ in the infrared spectra of the thiosemicarbazones shift to 1590–1534 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1–3**), in agreement with coordination of the azomethine nitrogen [12,24–26]. The $\nu(\text{CS})$ absorption observed at 790 and 780 cm⁻¹ in the spectra of H2Bz4DH and H2Bz4Ph respectively, shifts to 742 and 750 cm⁻¹ respectively in the spectra of complexes (**1**) and (**3**), indicating coordination of the sulfur. The 48–30 cm⁻¹ shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [12,24]. The $\nu(\text{CS})$ absorption is observed at 800 cm⁻¹ in the spectrum of H2Bz4M, whereas in complex (**2**) it is found at 780 cm⁻¹, according to coordination of a thione sulfur [26]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 607–595 cm⁻¹ in the spectra of the uncomplexed thiosemicarbazones shifts to 643–613 cm⁻¹ in complexes (**1–3**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [12,13,24–26].

In the spectra of complexes (**1–3**) the absorptions at 475–445 cm⁻¹ and 444–421 cm⁻¹ were attributed to the $\nu(\text{Sb}-\text{N})$ and $\nu(\text{Sb}-\text{S})$ (imine) vibrations and those at 231–218 cm⁻¹ to $\nu(\text{Sb}-\text{N}_{\text{py}})$ vibrations [27]. Therefore in the complexes the thiosemicarbazones are attached to the metal through the N_{py}-N-S

chelating system. The absorptions attributed to $\nu(\text{Sb}-\text{Cl})$ were observed at 356–308 cm⁻¹ in the spectra of the complexes [28].

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their antimony (III) complexes were recorded in DMSO-*d*₆ because this is the only solvent which dissolves all ligands and complexes. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signals of all hydrogens and carbons are duplicated in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the thiosemicarbazones, indicating the presence of the *Z* and *E* configurational isomers in the DMSO-*d*₆ solution. In the first N(3)-H is hydrogen bonded to the hetero-aromatic nitrogen while in the second N(3)-H is hydrogen bonded to the solvent [12–14,24,25]. The signals of N3-H at δ 12.58 and 8.57 ppm (H2Bz4DH), δ 12.83 and 8.69 ppm (H2Bz4M) and δ 13.14 and 10.63 ppm (H2Bz4Ph) were attributed to the *Z* and *E* isomers respectively [12–14,24,25].

In the ¹H and ¹³C NMR spectra of complexes (**1–3**) only one signal was observed for each hydrogen and each carbon. The absence of the N(3)-H signal in the spectra of **1** and **3** indicates coordination of an anionic thiosemicarbazone. The signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free bases. Similarly, the signals of C=N, C=S and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination of the thiosemicarbazones through the N_{py}-N-S chelating system, with adoption of the *EZ* conformation in relation to the C7-N2 and N3-C8 bonds [12–14,24,25].

2.3. X-ray diffraction analysis

Table 1 reports crystal data and refinement results for [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**). The atom arrangements and atom numbering scheme for complex (**3**) are shown in Fig. 2, while selected geometric parameters are listed in Table 2(a and b). The geometry about antimony is "pseudo" octahedral due to the lone pair of electrons. The anionic thiosemicarbazone is coordinated to metal together with two chloride ions. The chlorine atoms are in a *trans* arrangement with a Cl(2)-Sb(1)-Cl(1) angle of 158.55(4)°. Distortions from an ideal octahedral arrangement arises also from the small N-Sb-N and N-Sb-S chelate bite angles, which are all less than 80° (see Table 2b).

The fragment of the molecule comprising of chelate ring [C8,C7,C2,N1,N2,N3,S1] and Sb atom, is essentially planar. It is nearly orthogonal to the phenyl group [C15-C20] {83.46(0.11)}° and makes an angle of 20.38(0.18)° with the remaining phenyl group [C9-C14].

Details of hydrogen bonds are listed in Table 3. Of interest, symmetry related N(4)-H(4)⋯Cl(1)ⁱ hydrogen bonds result in the formation of chains [symmetry code: i: 1 + x, y, z] (see Fig. 3). Weaker intermolecular interactions, C(4)-H(4)⋯Cl(2)ⁱⁱ, C(5)-H(5)⋯Cl(2)ⁱⁱⁱ and C(19)-H(19)⋯Cl(1)^{iv} further link the molecules [symmetry codes: ii: = -x, 1 - y, 1 - z; iii: -1 + x, y, z; iv: = x, 1/2 - y, 1/2 + z]. Additionally, Platon analysis indicated a variety of $\pi\cdots\pi$ and CH $\cdots\pi$ interactions, which are listed in Supplementary Table 1.

The crystal structure of H2Bz4Ph has been previously determined by some of us [24]. As expected, the C8=S bond distance, which is 1.663(2) Å in H2Bz4Ph [24], goes to 1.725(4) Å in complex (**3**), due to a variation in the bond order, which has a double bond character in the free thiosemicarbazone and a predominantly single bond character in the complex. This effect results from deprotonation at N3 with formation of a highly delocalized system involving the thiosemicarbazone chain and the hetero-aromatic ring. Similarly, the N3-C8 bond varies from 1.360(2) Å in the free thiosemicarbazone [24] to 1.311(5) Å in **3** due to this same effect.

Table 1
Crystal data and refinement results for [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (3).

Identification code	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₅ Cl ₂ N ₄ SSb
Formula weight (g mol ⁻¹)	524.06
Temperature	120(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
a (Å)	7.8608(2)
b (Å)	22.6092(9)
c (Å)	11.6130(5)
β (°)	93.948(2)
Volume (Å ³)	2059.04(13)
Z	4
Density (calculated) (Mg/m ³)	1.691
Absorption coefficient, μ (mm ⁻¹)	1.712
F(000)	1032
Crystal size	0.70 × 0.10 × 0.10 mm
θ range (°)	3.16–27.52
Index ranges	−9 ≤ h ≤ 10 −29 ≤ k ≤ 29 −15 ≤ l ≤ 15
Reflections collected/unique (R _{int})	26 591/4701(0.0580)
Reflections observed (>2σ)	3575
Data completeness	0.993 to θ = 27.48
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	4701/0/247
Goodness-of-fit on F ²	1.067
Final R indices (I > 2σ (I))	R ₁ = 0.0404 wR ₂ = 0.0969
R indices (all data)	R ₁ = 0.0623 wR ₂ = 0.1096
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.984 and −1.116

A twisting of 180° in the N2–N3 bond of the thiosemicarbazone to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced, with variation of the thiosemicarbazone conformation from *ZE* when free [24] to *EZ* in **3**. The bond angles undergo important changes on coordination. Hence, the N2–N3–C8 angle goes from 120.5(2)° in H2Bz4Ph [24] to 116.0(3)° in **3**; N3–C8–S varies from 117.7(1)° in H2Bz4Ph [24] to 126.1(3)° in **3**; N4–C8–S goes from 124.8(2)° in H2Bz4Ph [24] to 115.6(3)° in **3**, and C7–N2–N3 goes from 119.4(2)° in H2Bz4Ph [24] to 115.4(3)° in **3**.

2.4. Cytotoxicity against human leukemia cell lines

The cytotoxic activities of the free thiosemicarbazones, their antimony(III) complexes (**1–3**) and the antimony salt were assayed on leukemia lines, including HL-60 (human promyelocytic leukemia cells), HL-60.Bcl-X_L, HL-60.Bcl2 (HL-60 ectopically

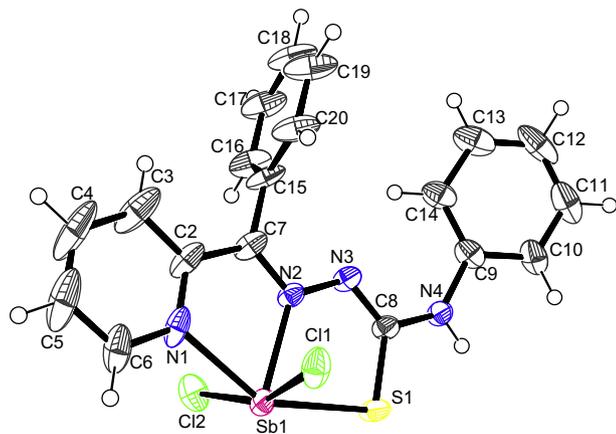


Fig. 2. Atom arrangement and atom numbering scheme for molecule of [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (3). Probability ellipsoids are drawn at the 50% level. Hydrogens on nitrogens are drawn as spheres of arbitrary radii.

Table 2a
Selected bond lengths for H2Bz4Ph and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (3).

Atoms	Bond lengths (Å)	
	H2Bz4Ph ^a	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂]
Sb(1)–N(2)	–	2.252(3)
Sb(1)–N(1)	–	2.308(3)
Sb(1)–Cl(1)	–	2.6114(12)
Sb(1)–Cl(2)	–	2.5286(12)
Sb(1)–S(1)	–	2.5733(10)
N(1)–C(2)	1.343(2)	1.341(6)
N(1)–C(6)	1.335(3)	1.330(6)
S(1)–C(8)	1.663(2)	1.725(4)
N(3)–C(8)	1.360(2)	1.311(5)
N(2)–C(7)	1.296(2)	1.301(5)
N(2)–N(3)	1.326(2)	1.368(4)

^a From Ref. [24].

expressing anti-apoptotic proteins Bcl-X_L and Bcl2, respectively), HL-60.BcrAbl (HL-60 ectopically expressing the tyrosine kinase Bcr. abl) and Jurkat (an immortalized line of T lymphocyte cells).

The antiproliferative effect of the compounds was evaluated by measuring the level of cell proliferation after incubation of cells with the test samples, using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay, which evaluates the capacity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase of viable cells to reduce MTT to formazan crystals. The results, expressed as percentage of cell proliferation compared with cells control (cells treated with vehicle, DMSO 0.1%) are depicted in Fig. 4. Cisplatin, a reference drug currently used on clinic, was assayed as positive control.

In general, it was shown that HL-60.Bcl-X_L, HL-60.Bcl2 and HL-60.BcrAbl cells were less sensitive to the studied compounds, which were only able to inhibit 50% or less of cell proliferation at 10 μM. Hence the IC₅₀ values against these three cell lines were not determined. HL-60 cells were more susceptible to the thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes than the Jurkat cell line as inferred by the determined IC₅₀ values, except for H2Bz4DH, which showed higher cytotoxicity against the Jurkat cell line (see Table 4).

Such differences might be due to different expression levels of anti-apoptotic proteins in the different types of tumors, as well as to other multi-factorial mechanisms of drug resistance that have not been investigated here. However, all thiosemicarbazones

Table 2b
Selected bond angles for H2Bz4Ph and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (3).

Atoms	Angles (°)	
	H2Bz4Ph ^a	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)
N(2)–Sb(1)–N(1)	–	70.31(12)
N(1)–Sb(1)–Cl(2)	–	79.56(9)
N(1)–Sb(1)–S(1)	–	144.82(10)
N(2)–Sb(1)–Cl(1)	–	83.08(8)
Cl(2)–Sb(1)–Cl(1)	–	158.55(4)
N(2)–Sb(1)–Cl(2)	–	83.26(9)
N(2)–Sb(1)–S(1)	–	74.51(8)
Cl(2)–Sb(1)–S(1)	–	96.34(4)
N(1)–Sb(1)–Cl(1)	–	80.30(9)
S(1)–Sb(1)–Cl(1)	–	95.86(4)
N(1)–C(2)–C(7)	118.10(16)	115.3(3)
C(2)–C(7)–N(2)	127.5(2)	117.4(4)
C(7)–N(2)–N(3)	119.4(2)	115.4(3)
N(2)–N(3)–C(8)	120.5(2)	116.0(3)
N(3)–C(8)–S(1)	117.7(1)	126.1(3)
S(1)–C(8)–N(4)	124.8(2)	115.6(3)
N(3)–C(8)–N(4)	114.3(2)	118.2(3)
C(8)–N(4)–C(9)	130.4(2)	130.2(4)

^a From Ref. [24].

Table 3
Hydrogen bonds distances (Å) and angles (°) for [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**).

[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (3) D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D–H...A)	(D–H...A)
N(4)–HN(4)···Cl(1) [1 + x,y,z]	0.86(4)	2.66(4)	3.489(3)	162(4)
C(4)–H(4)···Cl(2) [–x,1 – y,1 – z]	0.95	2.78	3.610(6)	147
C(5)–H(5)···Cl(2) [–1 + x,y,z]	0.95	2.52	3.402(5)	154
C(19)–H(19)···Cl(1) [x,1/2 – y,1/2 + z]	0.95	2.80	3.701(7)	159

The symmetry transformations used to generate equivalent atoms are bracketed.

inhibited cell proliferation, in a dose-dependent manner in both HL-60 and Jurkat leukemia cell lines. Among the thiosemicarbazones H2Bz4DH proved to be the most active against Jurkat cells and H2Bz4Ph the most active against HL60 cells. Coordination of H2Bz4DH to antimony(III) did not result in cytotoxicity improvement, but upon coordination of H2Bz4M and H2Bz4Ph to antimony(III) the IC₅₀ values substantially decrease against both cell lines. Complexes **2** and **3** demonstrated cytotoxic effect at nanomolar concentrations against the HL-60 cell line (Table 4). SbCl₃ exhibited high cytotoxic activity against HL-60 cells but it proved to be much less toxic to Jurkat cells. Hence a synergistic effect involving the metal and the thiosemicarbazones could probably in part explain the improved cytotoxic activity of **2** and **3** against HL-60 cells. Cisplatin exerted a much lower effect than **2** and **3** against this cell lineage.

Some works have demonstrated that over-expression of Bcl2 and Bcl-X_L in cells confers resistance to several cytotoxic stimuli induced by drugs. This anti-apoptotic protein regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. It can also inhibit changes in cells treated with apoptotic stimuli and prevent cell death by apoptosis, promoting cell survival. Consequently, this resistance is due to the inhibition of activation of the mitochondrial pathway involved on the death by apoptosis [29,30]. In this context, our preliminary results support the idea that the cytotoxic effect of the studied compounds against HL-60 cells may be associated with induction of cell death by apoptosis. Corroborating with this, the reduced cytotoxic effect of compounds in HL-60. BcrAbl also suggest that they possess a pro-apoptotic profile, since BcrAbl, the tyrosine-kinase implicated in Philadelphia (Ph) chromosome-positive leukemia, is one of the most potent anti-apoptotic genes [31].

In order to investigate the relationship between cell proliferation inhibition induced by the studied compounds with apoptosis induction, we decided to detect the subdiploid DNA contents as indicative of DNA fragmentation by apoptosis. We used the modified Nicoletti procedure (detection of hypodiploid DNA fragmentation and content by flow cytometry) for quantification of apoptotic cells. It is based on the principle that apoptotic cells, among other typical features, are characterized by DNA fragmentation and, consequently, loss of nuclear DNA content. Use of a fluorochrome, such as propidium iodide (PI), that is capable of binding and labeling DNA, makes it possible to obtain a rapid and precise evaluation of cellular DNA content by flow cytometric analysis, and subsequent identification of hypodiploid cells [32].

Since our preliminary data demonstrated that cytotoxic compounds to HL-60 cells were less cytotoxic against the lineages expressing anti-apoptotic proteins, we evaluated this effect on HL-60 and Jurkat cells.

Corroborating with our previous observation, at 10 μM, the studied compounds, except H2Bz4M, were able to induce 45–61% DNA fragmentation in HL-60 cells but had a poor effect on Jurkat cells (see Table 5). Since the studied compounds were cytotoxic to Jurkat cells without inducing significant DNA fragmentation, a non-apoptotic mechanism could possibly take place in this case.

SbCl₃ induced 32% DNA fragmentation on HL-60 cells. Interestingly, while H2Bz4M did not significantly induce DNA fragmentation on HL-60 cells, its antimony(III) complex induced 61% DNA fragmentation, which is much greater than the effect exerted by the antimony(III) salt *per se*. In these experiments, cisplatin used as reference induced significant DNA fragmentation in HL-60 cells, as previously described [33].

The enhanced DNA fragmentation in HL-60 cells clearly demonstrates that the studied compounds possess a pro-apoptotic potential. The above mentioned results indicate that coordination to antimony(III) might be an interesting strategy for increasing thiosemicarbazones' cytotoxicity against leukemia cell lines.

3. Experimental

3.1. Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. The thiosemicarbazones were prepared according to procedures previously employed by us [12,13,24–26]. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr discs (400–400 cm⁻¹) and nujol mulls between CsI plates (400–200 cm⁻¹). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and TMS as internal reference.

3.2. Synthesis of antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone, N(4)-methyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone and N(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone: [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (**1**), [Sb(H2Bz4M)Cl₃]·2H₂O (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**)

The antimony(III) complexes were obtained by stirring under reflux an ethanol solution of the desired thiosemicarbazone (1.0 mmol) with an equimolar amount of SbCl₃ for 3 h. The solids were washed with ethanol, diethylether and then dried *in vacuo*. A crystal of complex (**3**) suitable for X-ray diffraction was obtained by slow evaporation from a 9:1 acetone/DMSO solution.

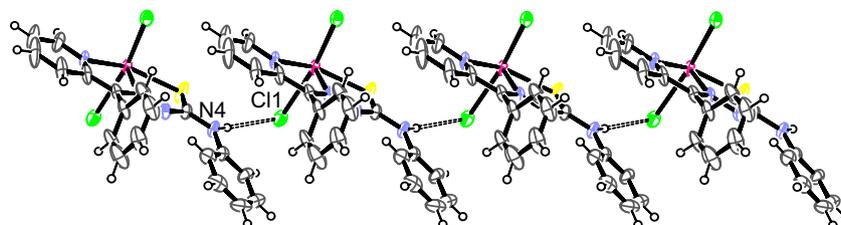


Fig. 3. Chains formed by N(4)–H(4)···Cl(1)ⁱ hydrogen bonds [symmetry code: i: 1 + x,y,z].

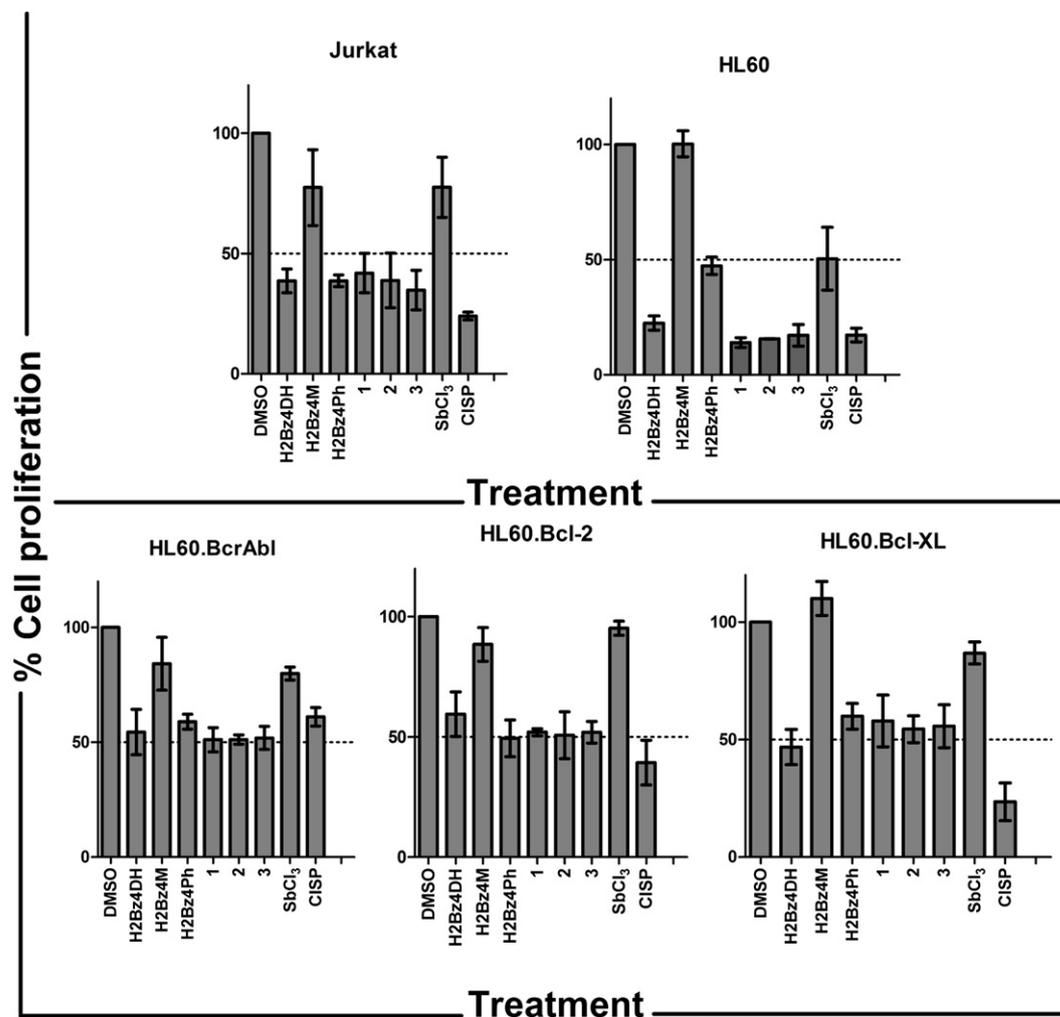


Fig. 4. Cytotoxic effect of thiosemicarbazones and complexes (1–3) on Jurkat and HL-60 human leukemia cell lines, and on HL-60 cells with ectopic expression of BcrAbl, Bcl-2 or Bcl-X_L. Cells were treated with compounds (10 μM) for 48 h and the cell proliferation/cell survival was measured by the MTT assay. Data are expressed as mean \pm SEM of percentage of cell proliferation compared to control (cells treated with DMSO 0.1%). Representative data of at least three independent experiments performed in triplicate.

3.2.1. (2-Benzoylpyridinethiosemicarbazono)dichloroantimony (III) [Sb(2Bz4DH)Cl₂] (1)

Yellow solid. Anal. Calc. (C₁₃H₁₁Cl₂N₄SSb): C, 34.85; H, 2.47; N, 12.51. Found: C, 35.23; H, 2.37; N, 12.58%. FW: 447.98 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{NH})$ 3264s, $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1598s, $\nu(\text{CS})$ 742m, $\rho(\text{py})$ 633w. IR (CsI/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{M}-\text{N})$ 445w, $\nu(\text{M}-\text{S})$ 421m, $\nu(\text{M}-\text{Npy})$ 231w, $\nu(\text{M}-\text{l})$ 355s, 316w. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆, $\delta(\text{ppm})$, *J* (Hz)]: 8.03 [s, 1H, N(4)Ha], 7.99 [s, 1H, N(4)Hb], 9.12 [d, 1H, H(6), 4.55], 8.17 [t, 1H, H(4), 6.96], 7.59 [t, 1H, H(5), 5.91], 7.36 [d, 1H, H(3), 5.27]. ¹³C NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆, $\delta(\text{ppm})$]: 173.18 [C(8)], 146.18 [C(7)], 143.57 [C(6)], 124.57 [C(5)], 141.21 [C(4)], 124.91 [C(3)], 153.11 [C

(2)]. $\Lambda_{\text{M}} = 15.16 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 247.3–251.7 °C. Yield 56%.

3.2.2. Trichloro(N(4)-methyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazono)antimony(III) dihydrate [Sb(H2Bz4M)Cl₃]·2H₂O (2)

Yellow solid. Anal. Calc. (C₁₄H₁₄Cl₃N₄SSb): C, 31.46; H, 3.39; N, 10.98. Found: C, 31.23; H, 3.16; N, 10.50%. FW: 498.46 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{NH})$ 3295s, $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1590s, $\nu(\text{CS})$ 780m, $\rho(\text{py})$ 613w. IR (CsI/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{M}-\text{N})$ 475w, $\nu(\text{M}-\text{S})$ 444m, $\nu(\text{M}-\text{Cl})$ 335s,

Table 5

Percentage of DNA fragmentation in leukemia cells induced by the thiosemicarbazones and their antimony (III) complexes.

Compound	HL 60	Jurkat
DMSO	3.16 \pm 1.74	2.22 \pm 0.74
SbCl ₃	32.17 \pm 3.33	3.17 \pm 1.73
H2Bz4DH	45.31 \pm 4.15	5.08 \pm 3.69
H2Bz4M	8.06 \pm 2.25	5.31 \pm 2.17
H2Bz4Ph	55.85 \pm 5.19	4.36 \pm 2.47
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂]	45.31 \pm 2.63	4.95 \pm 2.17
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃]	60.59 \pm 11.44	5.05 \pm 4.04
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂]	43.99 \pm 14.22	11.64 \pm 4.41
Cisplatin	86.05 \pm 4.80	6.95 \pm 0.96

Table 4

Inhibition (IC₅₀, μM) of HL-60 and Jurkat cells proliferation by the thiosemicarbazones and their antimony (III) complexes. Representative data of at least three independent experiments performed in triplicate.

Compound	HL 60 IC ₅₀ (μM)	Jurkat IC ₅₀ (μM)
H2Bz4DH	7.01 \pm 0.71	2.61 \pm 0.99
H2Bz4M	>100	>100
H2Bz4Ph	0.22 \pm 0.06	8.81 \pm 3.09
[Sb(2Bz4DH)Cl ₂]	8.16 \pm 1.68	11.64 \pm 2.31
[Sb(H2Bz4M)Cl ₃]·2H ₂ O	0.06 \pm 0.03	1.50 \pm 0.19
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂]	0.05 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03
SbCl ₃	1.84 \pm 1.11	>100
Cisplatin	0.83 \pm 0.05	1.04 \pm 0.73

HL-60 and Jurkat cells were treated with compounds (10 μM) for 24 h. Sub-diploid DNA content was determined by flow cytometric analysis. Representative data of at least two independent experiments performed in duplicate. Positive control: cisplatin (10 μM).

308w. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm), *J* (Hz)]: 12.79 [s, 1H, N(3)H], 8.40 [s, 1H, N(4)H], 9.13 [d, 1H, H(6), 4.42], 8.21 [t, 1H, H(4), 7.80], 7.84 [t, 1H, H(5), 5.67], 7.35 [d, 1H, H(3), 7.82]. ¹³C NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 162.68 [C(8)], 148.82 [C(7)], 144.86 [C(6)], 127.78 [C(5)], 141.80 [C(4)], 122.54 [C(3)], 141.65 [C(2)]. $M_M = 30.62 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 300 °C (dec). Yield 75%.

3.2.3. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazonato)antimony(III) [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**)

Yellow solid. Anal. Calc. (C₁₉H₁₆Cl₂N₄Sb): C, 43.54; H, 2.88; N, 10.69. Found: C, 43.92; H, 2.87; N, 10.82%. FW: 525.08 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(NH) 3436m, ν(C=N) 1534s, ν(CS) 750m, ρ(py) 643w. IR (Csl/nujol, cm⁻¹): ν(M-N) 474w, ν(M-S) 431m, ν(M-Npy) 218w, ν(M-Cl) 329s 311w. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm), *J* (Hz)]: 10.35 [s, 1H, N(4)H], 9.26 [d, 1H, H(6), 4.63], 8.24 [t, 1H, H(4), 7.57], 7.89 [t, 1H, H(5), 7.03], 7.40 [d, 1H, H(3), 8.04]. ¹³C NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 132.76 [C(15)], 139.52 [C(9)], 167.43 [C(8)], 145.04 [C(7)], 145.29 [C(6)], 126.83 [C(5)], 141.92 [C(4)], 127.59 [C(3)], 151.44 [C(2)]. $M_M = 58.03 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 227.3–230.0 °C. Yield 83%.

3.3. Crystallography

Data for complex (**3**) were obtained at 120 K with Mo *K*α 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 [34] and data reduction and unit cell refinement were achieved with the COLLECT [34] and DENZO programs [35]. Correction for absorption, by comparison of the intensities of equivalent reflections, was applied using the program SADABS [36]. The program ORTEP-3 for Windows [37] was used in the preparation of Figs. 2 and 3 and SHELXL-97 [38] and PLATON [39] in the calculation of molecular geometry. The structure was solved by direct methods using SHELXS-97 [40] and fully refined by means of the program SHELXL-97 [38]. 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 1.

3.4. Cytotoxic activity against leukemia cell lines

3.4.1. Materials

Cisplatin, methylthiazole tetrazolium (MTT), RPMI-1460, *L*-glutamine, and Antibiotic/Antimycotic Solution and fetal calf serum were purchased from Gibco (Grand Island, NY).

3.4.2. Cell lines

Human immortalized line of T lymphocyte – Jurkat cells, HL-60 cells (wild type human promyelocytic leukemia), HL-60.Bcl2 (HL-60 cells ectopically expressing Bcl2), HL-60.Bcl-X_L (HL-60 cells ectopically expressing Bcl-X_L) and HL-60.BclAbl (HL-60 expressing kinase tyrosine BcrAbl) were kindly given by Dr. Gustavo Amarante-Mendes (São Paulo University, Brazil). All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640 supplemented 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of *L*-glutamine and 10% of fetal bovine serum. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

3.4.3. Evaluation of cytotoxic effect of compounds against human leukemia cell lines

The different leukemia cells were inoculated at 50.000 cells of per well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells prior to the addition of the test compounds. Freshly prepared solutions of the different substances were tested at 10 µM. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5% CO₂ and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.1% DMSO (negative control) and 10 µM of cisplatin (positive control). Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT. All substances were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), prior to dilution. The compounds that produced a growth inhibition more than 50% in the screen were tested using decreasing concentrations, i.e. six or seven consecutive ten-fold dilutions ranging from 1 × 10⁻⁵ M to 1 × 10⁻¹¹ M. The IC₅₀ values were determined graphically from concentration-effect curves using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). For comparison, the cytotoxicity of cisplatin was evaluated under the same experimental conditions both with and without 0.1% of DMSO. All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

3.4.4. In vitro cell viability assay – MTT assay

The MTT assay is a standard colorimetric assay, in which mitochondrial activity is measured by splitting tetrazolium salts with mitochondrial dehydrogenases in viable cells only [41]. Briefly, after 4 h of the end of incubation of cells with different compounds, 20 µL of MTT solution (5 mg/mL in phosphate-buffered saline) were added to each well, the supernatant was removed and 200 µL of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystal. The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 570 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, comparing with 0.1% DMSO control and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD treated – mean OD background)/(mean OD untreated cultured, i.e. 0.1% DMSO – mean OD blank wells) × 100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative [42].

3.4.5. DNA labeling and flow cytometry analysis

In order to detect apoptotic nuclei, cells were treated or not with different substances (10 µM) for 18 h. After incubation, the cells were re-suspended in hypotonic solution (50 µg/mL PI in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100) [43]. The samples were incubated for 4 h at 4 °C, and PI fluorescence of individual nuclei was measured using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California). The data were analyzed using the Lysis software (Becton Dickinson).

3.4.6. Statistical analysis

All experiments were performed at least three replicates per compound and results shown are the average of three independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Significance was tested by Student's *t* test.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

Appendix. Supplementary material

CCDC 765348 contains the supplementary crystallographic data for complex (3). These data can be obtained free of charge via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejmech.2010.05.044.

References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31–39.
- [2] R.A. Finch, M.C. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y.C. Cheng, A.C. Sartorelli, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 983–991.
- [3] R.A. Finch, M.C. Liu, A.H. Cory, J.G. Cory, A.C. Sartorelli, *Adv. Enzyme Regul.* 39 (1999) 3–12.
- [4] I. Gojo, M.L. Tidwell, J. Greer, N. Takebe, K. Seiter, M.F. Pochron, B. Johnson, M. Sznol, J.E. Karp, *Leuk. Res.* 31 (2007) 1165–1173.
- [5] L.R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 665–682.
- [6] J. Li, L.M. Zheng, I. King, T.W. Doyle, S.H. Chen, *Curr. Med. Chem.* 2 (2001) 121–133.
- [7] J.E. Karp, F.J. Giles, I. Gojo, L. Morris, J. Greer, B. Johnson, M. Thein, M. Sznol, J. Low, *Leuk. Res.* 32 (2008) 71–77.
- [8] T. Bal, B. Atasever, Z. Solakoglu, S.E. Kuruca, B. Ülküseven, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 161–167.
- [9] M.B. Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, A. Bonati, P. Lunghi, S. Pinelli, *J. Inorg. Biochem.* 83 (2001) 169–179.
- [10] M.X. Li, C.L. Chen, C.S. Ling, J. Zhou, B.S. Ji, Y.J. Wu, J.Y. Niu, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2009) 2704–2706.
- [11] K.S.O. Ferraz, L. Fernandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.F. Leite, E.M.S. Fagundes, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7138–7144.
- [12] A.P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M. S. Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 698–706.
- [13] A.E. Graminha, C. Rodrigues, A.A. Batista, L.R. Teixeira, E.S. Fagundes, H. Beraldo, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 69 (2008) 1073–1076.
- [14] A.P. Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. S. Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467–472.
- [15] D.J. Berman, *Rev. Infect. Dis.* 10 (1988) 560–586.
- [16] C.B.M. Tester-Dalderup, *Antiprotozoal drugs*. in: M.N.G. Dukes (Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs*, 13th ed. Elsevier, Amsterdam, 1996, pp. 799–842.
- [17] M.B. Lee, H.M. Gilbert, *Infect. Med.* 16 (1999) 37–45.
- [18] C. Silvestru, C. Socaciu, A. Bara, I. Haiduc, *Anticancer Res.* 10 (1990) 803–804.
- [19] E.R.T. Tiekink, *Critical Rev. Onc. Hemat.* 42 (2002) 217–224.
- [20] S. Wyllie, A.H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 257–267.
- [21] G. Brumatti, R. Weinlich, C.F. Chehab, M. Yon, G.P.A. Mendes, *FEBS Lett.* 541 (2003) 57–63.
- [22] M. Vogler, M. Butterworth, A. Majid, R.J. Walewska, X.M. Sun, M.J. Dyer, G. M. Cohen, *Blood* 113 (2009) 4403–4413.
- [23] H. Peng, N. Huang, J. Qi, P. Xie, C. Xu, J. Wang, C. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 3693–3699.
- [24] A.P. Rebolledo, G.M. Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J. D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 945–951.
- [25] R.F.F. Costa, A.P. Rebolledo, T. Matencio, H.D.R. Calado, J.D. Ardisson, M. E. Cortés, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, *J. Coord. Chem.* 58 (2005) 1307–1319.
- [26] I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1571–1577.
- [27] H.D. Yin, J. Zhai, *Inorg. Chim. Acta.* 362 (2009) 339–345.
- [28] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 2nd ed. Wiley-Interscience, New York, 1970, 327.
- [29] G. Brumatti, R. Weinlich, C.F. Chehab, M. Yon, G.P. Amarante-Mendes, *FEBS Lett.* 24 (2003) 57–63.
- [30] B. Lamothe, B.B. Aggarwal, *J. Interferon Cytokine Res.* 22 (2002) 269–279.
- [31] A.E.B.B. Silva, G. Brumatti, F.O. Russo, D.R. Green, G.P.A. Mendes, *Cell Death Diff.* 10 (2003) 592–598.
- [32] C. Riccardi, I. Nicoletti, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1458–1461.
- [33] K.V. Floros, H. Thomadaki, G. Lallas, N. Katsaros, M. Talieri, A. Scorilas, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010 (2003) 153–158.
- [34] R.W.W. Hooft, in: B.V. Nonius (Ed.), *COLLECT: Data Collection Software*, Delft, The Netherlands, 1998.
- [35] Z. Otowinowski, W. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. in: C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology, Macromolecular crystallography, Part A*, vol. 276. Academic Press, New York, 1997, pp. 307–326.
- [36] G.M. Sheldrick, *SADABS*. Version 2.10. Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA, 2003.
- [37] L.J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.* 32 (1999) 837–838.
- [38] G.M. Sheldrick, *SHELXL-97*. Program for Crystal Structure Refinement. University of Göttingen, Germany, 1997.
- [39] A.L. Spek, *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 7–13.
- [40] G.M. Sheldrick, *SHELXS-97*. Program for the Solution of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany, 1997.
- [41] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63.
- [42] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood, *Exp. Chem.* 50 (2004) 43–50.
- [43] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, *J. Immunol. Meth.* 139 (1991) 271–279.

Investigation on the pharmacological profile of antimony(III) complexes with hydroxyquinoline derivatives: anti-trypanosomal activity and cytotoxicity against human leukemia cell lines

Débora C. Reis · Mauro C. X. Pinto · Elaine M. Souza-Fagundes ·
Lucas F. Rocha · Valéria R. A. Pereira · Cristiane M. L. Melo ·
Heloisa Beraldo

Received: 30 September 2010 / Accepted: 2 January 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Complexes [Sb(QN)₂Cl] (**1**), [Sb(QC)₂Cl] (**2**) and [Sb(QI)₂Cl] (**3**) were obtained with 8-hydroxyquinoline (HQN), 5-chloro-8-hydroxyquinoline (HQC) and 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline (clioquinol, HQI). The quinoline derivatives and their antimony(III) complexes were evaluated for their anti-trypanosomal activity as well as for their cytotoxicity against HL-60 and Jurkat human leukemia cell lines. Upon coordination to antimony(III) the anti-trypanosomal activity of HQC and HQI increases, the highest improvement being observed for complex (**3**), which was the most active among all studied compounds against both epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. All quinoline derivatives proved to be cytotoxic against both leukemia cell lineages. Upon coordination to antimony(III) the cytotoxicity of HQN improved against Jurkat leukemia cells. While SbCl₃ proved to be cytotoxic against HL-60 cells, it was not active against Jurkat cells. However, its

coordination to the quinoline derivatives resulted in complexes with significant cytotoxicity against Jurkat cells.

Keywords 8-Hydroxyquinoline · 5-Chloro-8-hydroxyquinoline · 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline (clioquinol) · Antimony(III) complexes · Cytotoxicity · Leukemia · Anti-trypanosomal

Introduction

Human african trypanosomiasis, Chagas disease, and leishmaniasis, collectively a widespread group of parasitic diseases, are a daily threat to more than 550 million people in Mexico, Central America, South America, Sub-Saharan Africa, the Middle East, Indonesia, and India, and cause nearly 150,000 deaths annually. These diseases are caused by unicellular trypanosomatid parasites of the genera *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania* sp. *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, an endemic infection that affects mainly Central and South America, where 15 million people are infected (Tonin et al. 2010).

Unfortunately, drug therapy for these diseases has not changed significantly in the past 50 years. Currently used agents are far less than satisfactory due to extreme toxicity, or the emergence of resistant parasitic strains (Woster 2007). Nifurtimox (nfx) and

D. C. Reis · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br

M. C. X. Pinto · E. M. Souza-Fagundes
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

L. F. Rocha · V. R. A. Pereira · C. M. L. Melo
Laboratório de Imunogenética, Departamento de
Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ,
Pernambuco, Brazil

benznidazole (bnz), the drugs used in the treatment of Chagas disease, are effective only against the acute infection and require long-term treatment. Moreover, these compounds can cause systemic toxicity and serious side effects (Tonin et al. 2010).

Leishmania is a protozoan parasite responsible for several pathologies collectively known as leishmaniasis, an important public-health problem in Latin America. Leishmaniasis is caused by parasites that are injected into mammals via sandflies and is manifested as cutaneous and visceral lesions (Herwaldt 1999). It is estimated that 2 million of new cases occur each year, with at least 15–20 million infected people. The major clinical use of antimony compounds is as a treatment for leishmaniasis. However the literature reports that antimony(III) complexes with various organic ligands also display in vitro as well as in vivo anticancer activity (Tiekink 2002).

The chemistry of quinoline derivatives has attracted special interest due to their therapeutic properties. It has been shown that 8-hydroxyquinoline (HQN) and some of its derivatives exhibit substantial cytotoxic activity against cancer cells (Nordenberg et al. 1990). 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline, clioquinol (HQI), has been previously used as an antibiotic in animals and humans and shows anticancer activity both in vitro and in vivo (Yu et al. 2009). It has been reported that when mixed with copper, HQN and clioquinol inhibited proteasomal activity and proliferation in cultured human cancer cells (Zhai et al. 2010). Clioquinol was shown to induce apoptosis, and its actions can be potentiated by both copper and zinc (Ding et al. 2005). In addition clioquinol is being investigated for the treatment of Alzheimer's disease (AD) as a metal chelating agent, to be used in therapies based on modulation of metal metabolism (Filiz et al. 2008).

Trypanosomes and leishmania show several biochemical similarities such as the abundance of stage-regulated cysteine proteinases which play important roles in parasite virulence, in modulation of the host's immune response and in parasite differentiation (Mottram et al. 1998). Taking into consideration that antimony-based drugs are used in the treatment of leishmaniasis, in the present work we investigated the anti-trypanosomal activity of antimony(III) complexes with HQN, HQC (5-chloro-8-hydroxyquinoline) and HQI.

In a previous work we demonstrated that antimony(III) complexes with thiosemicarbazones present

significant anti-leukemia activity and were able to induce cell death through apoptosis (Reis et al. 2010). Since quinoline-based compounds show cytotoxic as well as antitumoral properties we also evaluated the effect of the HQN derivatives and their antimony(III) complexes on HL60 and Jurkat leukemia cell lines.

Experimental

Materials and methods

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Cisplatin, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT), propidium iodide (PI), sodium citrate, triton X-100, dimethylsulfoxide (DMSO), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1460 medium and L-glutamine were purchased from Sigma Chemicals. Antibiotic/antimicotic solution and fetal calf serum (FCS) were purchased from Gibco (Grand Island, NY).

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates ($400\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) and Nujol mulls between CsI plates ($400\text{--}200\text{ cm}^{-1}$). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO- d_6 or DMF- d_7 as the solvent and TMS as internal reference.

Syntheses of the antimony(III) complexes

SbCl₃ (1.0 mmol) powder was added to 3.0 mmol of the desired quinoline dissolved in 10.0 ml of ethanol. The mixture was kept at room temperature with stirring for 4 h. The obtained solids were filtered off then washed with diethylether and dried.

Bis(8-hydroxyquinolinato)(chloro)antimony(III) *[Sb(QN)₂Cl] (I)*

Yellow solid. Anal. Calc. (C₁₈H₁₂ClN₂O₂Sb): C, 48.53; H, 2.71; N, 6.29. Found: C, 47.91; H, 2.71; N, 6.06%. FW: 445.51 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1552s, $\nu(\text{CO})$ 1098m, ρ (py) 626m. IR

(CsI/Nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{M-Npy})$ 277w, $\nu(\text{M-Cl})$ 243w, $\nu(\text{M-O})$ 522w. ^1H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , (ppm), $J(\text{Hz})$] main signals: 9.09 [s, 1H, H(2)], 7.81 [m, 1H, H(3), 4.72], 8.70 [d, 1H, H(4), 8.33], 7.48 [d, 1H, H(5), 7.70], 7.61 [t, 1H, H(6), 7.67], 7.19 [d, 1H, H(7), 6.76]. ^{13}C NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})$] main signals: 146.71 [C(2)], 122.25 [C(3)], 140.40 [C(4)], 118.85 [C(5)], 129.37 [C(6)], 113.99 [C(7)]. $\Lambda_{\text{M}} = 23.32 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 271.1–275.6°C. Yield 67.6%.

Bis(5-chloro-8-hydroxyquinolinato)(chloro)antimony(III), [Sb(QC)₂Cl]·EtOH (2)

Yellow solid. Anal. Calc. ($\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{Sb}$): C 42.86; H, 2.88; N, 5.00. Found: C, 43.01; H, 2.77; N, 5.06%. FW: 560.47 g mol^{-1} . IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{OH}_{\text{EtOH}})$ 3436s, $\nu(\text{C=N})$ 1546m, $\nu(\text{CO})$ 1085m, $\rho(\text{py})$ 647m. IR (CsI/Nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{M-Npy})$ 277w, $\nu(\text{M-Cl})$ 236w, $\nu(\text{M-O})$ 542w. ^1H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})$, $J(\text{Hz})$] main signals: 9.08 [s, 1H, H(2)], 7.86 [m, 1H, H(3), 4.01], 8.67 [d, 1H, H(4), 8.36], 7.69 [d, 1H, H(6), 8.33], 7.15 [d, 1H, H(7), 8.37]. ^{13}C NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , $\delta(\text{ppm})$] main signals: 147.33 [C(2)], 123.43 [C(3)], 135.01 [C(4)], 118.10 [C(5)], 128.49 [C(6)], 113.01 [C(7)], 152.70 [C(8)], 137.26 [C(9)], 126.23 [C(10)]. $\Lambda_{\text{M}} = 30.36 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 298.7–300.2°C. Yield 97%.

Bis(5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinolinato)(chloro)antimony(III), [Sb(QI)₂Cl] (3)

Yellow solid. Anal. Calc. ($\text{C}_{18}\text{H}_8\text{Cl}_3\text{I}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Sb}$): C, 28.22; H, 1.05; N, 3.66. Found: C, 28.21; H, 1.08; N, 3.80%. FW: 766.19 g mol^{-1} . IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{C=N})$ 1566m, $\nu(\text{CO})$ 1097m, $\rho(\text{py})$ 647m. IR (CsI/Nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{M-Npy})$ 280w, $\nu(\text{M-Cl})$ 232w, $\nu(\text{M-O})$ 570w. ^1H NMR [200 MHz, DMF- d_7 , $\delta(\text{ppm})$, $J(\text{Hz})$] main signals: 9.40 [s, 1H, H(2)], 7.96 [s, 1H, H(3)], 8.94 [s, 1H, H(4)], N.O [s, 1H, H(6)], N.O. [s, 1H, H(7)]. ^{13}C NMR [200 MHz, DMF- d_7 , $\delta(\text{ppm})$] main signals: 147.80 [C(2)], 124.16 [C(3)], 137.29 [C(4)], 118.39 [C(5)], N.O. [C(6)], 83.13 [C(7)], N.O. [C(8)], N.O. [C(9)], 127.67 [C(10)]. $\Lambda_{\text{M}} = 97.14 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 271.1–273.3°C. Yield 51%. NO, non-observed.

Cytotoxicity in spleen cells and anti-trypansomal activity

Animals

Male BALB/c mice (6–8 weeks old) were raised at the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained at the animal facilities of the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil. All mice were sacrificed and treated in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation Commission for Experiments with Laboratory Animals (Ministry of Health, Brazil, 0266/05).

Obtaining spleen cells

Spleen cells were obtained according to the literature (Pereira et al. 2004). After euthanizing the animal with CO_2 gas, the spleen of each mouse was removed aseptically and placed in Falcon tubes containing RPMI 1640 with 10% of FCS (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a Petri dish where they were macerated. The obtained cell suspensions were transferred to Falcon tubes containing approximately 10 ml of incomplete medium, centrifuged at 4°C, 200×g for 5 min. After discarding the supernatant, distilled water was added to the sediment to promote lysis of red blood cells. The supernatant, containing no cellular debris was collected and centrifuged at 4°C, 200×g for 5 min. The sediment (containing cells) was re-suspended in complete RPMI 1640. An aliquot of each cell suspension was separated, diluted in trypan blue to be quantified in a Neubauer chamber and the cell viability was determined.

In vitro cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds was determined using BALB/c mice splenocytes (6×10^5 cells well^{-1}) cultured in 96-well plates in RPMI 1640 media (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% of FCS (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil). Each compound was evaluated in six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), in triplicate on two independent assays. Cultures were incubated in the presence of

^3H -thymidine (Amersham Biosciences) ($1\ \mu\text{Ci well}^{-1}$) for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . After this period, the content of the plate was harvested to determine the ^3H -thymidine ($[\text{}^3\text{H}]\text{TdR}$) incorporation using a beta-radiation counter (β -matrix 9600, Packard). The cytotoxicity of the compounds was determined by comparing the percentage of ^3H -thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) of imidazolidines-treated wells in relation to untreated wells. Non-cytotoxic concentrations were defined as those causing a reduction of ^3H -thymidine incorporation below 30% in relation to untreated controls.

Inhibition of *T. cruzi* growth

Epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) were cultivated at 26°C in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) supplemented with 10% FCS, 1% hemin, 1% R9 medium and $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin. Parasites ($10^6\ \text{ml}^{-1}$) were cultured in a fresh medium in the absence or in the presence of the compounds being tested (from stock solution in DMSO). Cell growth was determined after 11 days of culture by counting viable forms in a hemacytometer, in triplicate. The compounds used were from a stock solution in DMSO. To determine the IC_{50} , cultures of Y strain epimastigotes in the presence of different concentrations of the compounds were evaluated after 11 days as described above. IC_{50} calculation was carried out using non-linear regression on PRISM 4.0 GRAPH-PAD software. Y strain *T. cruzi* trypomastigotes were obtained from culture supernatants of Vero cell line at 37°C and placed in 96-well plates ($4 \times 10^5\ \text{well}^{-1}$) in a RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin. Viable parasites were counted in a hemacytometer 24 h after addition of the studied compounds by way of trypan blue exclusion. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures.

Cytotoxic activity against HL60 and Jurkat leukemia cell lines

Jurkat cells (human immortalized line of T lymphocyte) and HL60 cells (human promyelocytic leukemia HL-60 cells) were kindly given by Dr. Gustavo Amarante-Mendes (São Paulo University, Brazil). All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640 medium supplemented 100

U ml^{-1} penicillin and $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of L-glutamine and 10% of fetal bovine serum. All cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

The leukemia cells were inoculated at 50,000 cells of per well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37°C to allow adaptation of cells prior to the addition of the test compounds. Freshly prepared solutions of the different substances were tested at $10\ \mu\text{M}$. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5% CO_2 and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.1% DMSO (negative control) and $10\ \mu\text{M}$ of cisplatin (positive control). Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT. All substances were dissolved in DMSO, prior to dilution. The compounds that produced a growth inhibition more than 50% in the screen were tested using decreasing concentrations, i.e. six or seven consecutive ten-fold dilutions ranging from 1×10^{-5} to 1×10^{-11} M. The IC_{50} values were determined graphically from concentration-effect curves using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). For comparison, the cytotoxicity of cisplatin was evaluated under the same experimental conditions both with and without 0.1% of DMSO. All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

MTT is a standard colorimetric assay, in which mitochondrial activity was measured by splitting tetrazolium salts with mitochondrial dehydrogenases in viable cells only (Mosmann 1983). Briefly, after 4 h of the end of incubation of cells with different compounds, $20\ \mu\text{l}$ of MTT solution ($5\ \text{mg ml}^{-1}$ in phosphate-buffered saline) were added to each well, the supernatant was removed and $200\ \mu\text{l}$ of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystal. The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 570 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, comparing with 0.1% DMSO control and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD treated – mean OD background)/mean OD

untreated cultured, i.e. 0.1% DMSO – mean OD blank wells) \times 100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative (Ulukaya et al. 2004).

All experiments were performed at least three replicates per compound and results shown are the average of three independent experiments. Data are represented as mean \pm SEM. Significance was tested by Student's test *t*.

Results and discussion

Microanalyses were compatible with the formation of [Sb(QN)₂Cl] (**1**), [Sb(QC)₂Cl].EtOH (**2**) and [Sb(QI)₂Cl] (**3**). In **1–3** there are two anionic ligands and one chloride ion in the metal coordination sphere. In complex (**2**) one crystallization ethanol molecule is present, as confirmed by its thermogravimetric curve which shows a weight loss of 7.8% (calcd. 8.2%) in the 60–110°C range, corresponding to the loss of one ethanol molecule.

Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{N})$ at 1587–1604 cm^{-1} in the infrared spectra of the free bases shift to 1546–1566 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1–3**), in agreement with coordination of the nitrogen (Wagner et al. 2007). The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 575–634 cm^{-1} in the spectra of the free hydroxyquinolines shifts to 636–647 cm^{-1} in complexes (**1–3**), suggesting coordination of the heteroaromatic nitrogen (Wagner et al. 2007). The $\nu(\text{C}-\text{O})$ absorption observed at 1059–1084 cm^{-1} in the spectra of the uncomplexed HQN derivatives shifts to 1085–1097 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1–3**), indicating coordination of the oxygen (Yurdakul and Arýcý 2004). New absorptions at 277–280 and 522–570 cm^{-1} in the spectra of **1–3** were attributed to the $\nu(\text{Sb}-\text{N}_{\text{py}})$ and $\nu(\text{Sb}-\text{O})$ modes, respectively, and absorptions at 232–243 cm^{-1} were assigned to the $\nu(\text{Sb}-\text{Cl})$ vibration (Yin and Zhai 2009; Nakamoto 1970).

The NMR spectra of HQN and of HQC were recorded in DMSO-*d*₆. The spectrum of HQI was recorded in DMF-*d*₇ because its antimony(III)

complex (**3**) is more soluble in this solvent than in DMSO-*d*₆. The spectra of complexes (**1**) and (**2**) were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The ¹H NMR spectra of complexes (**1–3**) do not show the signal of C(8)–OH, in accordance with coordination of two anionic ligands. In the ¹³C NMR spectrum the signals of the pyridine carbons and those of the phenolic carbons undergo significant shifts upon complexation, in accordance with coordination through the pyridine nitrogen and the phenolate oxygen. In the ¹H NMR spectrum of **2** the signals attributed to ethanol were observed, in accordance with the proposed formulation.

Anti-trypansomal activity

The HQN derivatives inhibited the growth of both epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* (see Table 1). HQN and HQC showed higher activity against the trypomastigote form than HQI. However, HQI was the most active derivative against the epimastigote form. Upon coordination to antimony(III) the activity of HQC and HQI increases, the highest improvement being observed for complex

Table 1 Anti-trypansomal activity of 8-hydroxyquinoline derivatives, their antimony(III) complexes, SbCl₃ and the reference compounds benznidazole and nifurtimox

Compound	Cytotoxicity ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	IC ₅₀ tripo ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	IC ₅₀ epi. ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
HQN	<6.89	4.47	3.37
HQC	<5.57	3.95	3.28
HQI	<3.27	21.96	2.65
[Sb(QN) ₂ Cl] (1)	<2.24	4.20	1.68
[Sb(QC) ₂ Cl] (2)	1.72	1.22	0.93
[Sb(QI) ₂ Cl] (3)	<1.30	1.28	0.56
SbCl ₃	<4.38	65.75	6.79
bnz	96.06	6.26	6.65
nfx	3.48	2.75	1.88

bnz benznidazole, nfx nifurtimox

(3), which was the most active among all studied compounds against both forms of *T. cruzi*. Unfortunately all compounds revealed to be cytotoxic at doses similar to or lower than their IC₅₀ values. However, it is worth noticing that the reference drug nfx was less active than complex (3), and exhibited a similar cytotoxic effect.

Cytotoxic activity against leukemia cells

All quinoline derivatives showed cytotoxic activity against the two leukemia cell lineages (see Table 2). HQN and HQC presented higher activity against HL-60 cells while HQI was slightly more cytotoxic against Jurkat cells. Upon coordination to antimony(III) the cytotoxicity of HQN improved against Jurkat leukemia cell lines while those of HQC and HQI did not undergo significant modification, considering the presence of two quinoline ligands per metal in the complexes. Interestingly while the starting antimony salt SbCl₃ proved to be cytotoxic against HL-60 cells, it was not cytotoxic against Jurkat cells. However, coordination to the quinoline derivatives resulted in complexes with significant cytotoxicity against Jurkat cells.

Although cisplatin proved to be more active against the two leukemia cell lines, the presently studied compounds revealed to be interesting, taking into consideration that a significant proportion of patients chronically treated with antitumoral drugs develop resistance.

Table 2 Cytotoxic activity (IC₅₀) of 8-hydroxyquinoline derivatives and their antimony(III) complexes on HL60 and Jurkat cell lines

Compound	HL60	Jurkat
HQN	8.84 ± 1.73	23.37 ± 1.59
[Sb(QN) ₂ Cl] (1)	4.95 ± 2.55	2.34 ± 0.89
HQC	4.88 ± 0.04	14.88 ± 0.31
[Sb(QC) ₂ Cl] (2)	3.46 ± 1.66	5.85 ± 0.99
HQI	15.80 ± 0.86	10.07 ± 1.13
[Sb(QI) ₂ Cl] (3)	6.37 ± 1.69	6.63 ± 2.29
Cisplatin	0.74 ± 0.16	1.36 ± 0.69
SbCl ₃	1.84 ± 1.11	>100

HL60 and Jurkat cells were treated with different concentrations of compounds for 48 h and proliferation/cell viability was evaluated by MTT assay. Representative data of three independent experiments performed in triplicate

Acknowledgments This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

References

- Ding W, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE (2005) Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res* 65:3389–3395
- Filiz G, Caragounis A, Bica L, Du T, Masters CL, Crouch PJ, White AR (2008) Clioquinol inhibits peroxide-mediated toxicity through up-regulation of phosphoinositol-3-kinase and inhibition of p53 activity. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1030–1042
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH (1998) Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1:455–460
- Nakamoto K (1970) Infrared spectra of inorganic and coordination compounds, 2nd edn. Wiley-Interscience, New York, p 327
- Nordenberg J, Novogrodsky A, Beery E, Patia M, Wasserman L, Warshawsky A (1990) Anti-proliferative effects and phenotypic alterations induced by 8-hydroxyquinoline in melanoma cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 26:905–907
- Pereira VRA, Lorena VMB, Galvão da Silva AP, Coutinho EM, Silva ED, Ferreira AGP, Miranda P, Krieger MA, Goldenberg S, Soares MBP, Correa-Oliveira R, Gomes Y (2004) Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. *Parasitology* 129:563–570
- Reis DC, Pinto MCX, Souza-Fagundes EM, Wardell SMSV, Wardell JL, Beraldo H (2010) Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines. *Eur J Med Chem* 45:3904–3910
- Tiekink ERT (2002) Antimony and bismuth compounds in oncology. *Crit Rev Oncol/Hematol* 42:217–224
- Tonin LTD, Panice MR, Nakamura CV, Rocha KJP, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Costa WF, Sarragiotto M (2010) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted-β-carboline)-3-carboxamides. *Biomed Pharmacother* 64:386–389
- Ulukaya E, Colakogullari M, Wood EJ (2004) Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy* 50:43–50
- Wagner CC, Calvo S, Torre MH, Baran EJ (2007) Vibrational spectra of clioquinol and its Cu(II) complex. *J Raman Spectrosc* 38:373–376
- Woster PM (2007) Antiprotozoal agents (African trypanosomiasis, Chagas disease, and leishmaniasis). In: Desai MC, Plattner JJ (eds) *Comprehensive medicinal chemistry II*. Elsevier Science, Oxford, pp 815–843
- Yin HD, Zhai J (2009) Synthesis, characterizations and crystal structures of antimony(III) complexes with nitrogen-containing ligands. *Inorg Chim Acta* 362:339–345

Yu H, Zhou Y, Linf SE, Ding WQ (2009) Clioquinol targets zinc to lysosomes in human cancer cells. *Biochem J* 417:133–139

Yurdakul S, Arýcý K (2004) Synthesis and vibrational spectra of metal halide complexes of 8-hydroxyquinoline in relation to their structures. *J Mol Struct* 691:45–49

Zhai S, Yang L, Cui QC, Sun Y, Dou QP, Yan B (2010) Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells. *J Biol Inorg Chem* 15:259–269



Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity

Josane A. Lessa^a, Débora C. Reis^a, Isolda C. Mendes^b, Nivaldo L. Speziali^c, Lucas F. Rocha^d, Valéria R.A. Pereira^d, Cristiane M.L. Melo^d, Heloisa Beraldo^{a,*}

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

^b Escola de Belas Artes, Departamento de Artes Plásticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2010

Accepted 4 November 2010

Available online 16 November 2010

Keywords:

Thiosemicarbazone

Antimony(III) complexes

Antitrypanosomal activity

ABSTRACT

The antimony(III) complexes [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**) were prepared with *N*(4)-phenyl-2-formyl- (H₂Fo4Ph), 2-acetyl- (H₂Ac4Ph) and 2-benzoylpyridine (H₂Bz4Ph) thiosemicarbazones. The antimony(III) complexes presented antitrypanosomal activity against the epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Complexes (**1**) and (**2**) exhibited higher activity than the reference drugs benznidazole and nifurtimox.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic diseases affect hundreds of millions people around the world, mainly in underdeveloped countries. Since parasitic protozoa are eukaryotic, they share many common features with their mammalian host making the development of selective drugs a hard task. Diseases caused by *Trypanosomatidae*, which share a similar state regarding drug treatment, include Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*) and leishmaniasis (*Leishmania* spp.). These trypanosomatids are responsible for an infected population of nearly 30 million and more than 400 million are at risk [1]. Chagas disease, or American Trypanosomiasis, remains the major parasitic disease burden in Latin America, despite recent advances in the control of its vectorial and transfusional transmission [2].

T. cruzi presents three main morphological forms. The epimastigote form replicates within the crop and midgut of Chagas' disease vectors as it is released with the insect excrements as the non-dividing highly infective trypomastigotes that invade mammalian tissues via wounds caused by blood sucking action. The parasite multiplies intracellularly as the amastigote form which is released as the non-dividing bloodstream trypomastigote form that invades other tissues [1].

Drugs currently used in the treatment of Chagas' disease are two nitroaromatic heterocycles, nifurtimox (nfx, Lampit[®]) and

benznidazole (bnz, Rochagan[®], Roche), introduced empirically over three decades ago [2]. These drugs have demonstrated several limitations in their use due to their low bioavailability and their limited efficacy in the different stages of the disease as well as the development of parasite resistance [3].

The pentavalent organoantimonials, meglumine antimoniate (antimony(V) *N*-methyl-glucamine) and sodium stibogluconate (sodium antimony(V) gluconate), are commonly used for the treatment of leishmaniasis. The mechanism of action of the antimonial drugs is not completely understood. It is possible that Sb(V) behaves as a prodrug which is probably reduced *in vivo* into Sb(III) by cellular thiols and/or specific enzymes [4]. In principle antimony compounds could also constitute new antitrypanosomal drugs candidates.

Thiosemicarbazones are an interesting class of compounds with a wide range of pharmacological applications [5] and have been identified as lead scaffolds of cruzain inhibitors [6,7]. Cruzain was shown to be one of the most relevant proteases in *T. cruzi* [7]. In many circumstances the pharmacological action of thiosemicarbazones increases upon coordination to metal ions [8–10]. We demonstrated that nitro-thiosemicarbazones and their copper(II) [11] and ruthenium(II) [12] complexes present significant *in vitro* anti-trypanosomal activity, the complexes being at least 5–25 times more active than the free ligands.

We recently started an investigation on the pharmacological profile of antimony(III) complexes with thiosemicarbazones and showed that these complexes exhibit high cytotoxicity against human leukemia cell lines [13].

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5740; fax: +55 31 3409 5700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

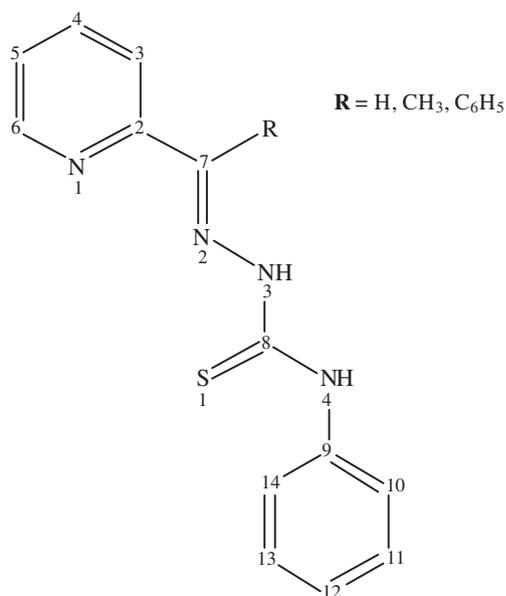


Fig. 1. Generic representation for *N*(4)-phenyl-2-pyridine-derived thiosemicarbazones.

In the present work, antimony(III) complexes of *N*(4)-phenyl-2-formyl- (*H*2Fo4Ph), 2-acetyl- (*H*2Ac4Ph) and 2-benzoylpyridine (*H*2Bz4Ph) thiosemicarbazones (Fig. 1) were assayed against *T. cruzi* strains. The strategy of associating thiosemicarbazones to antimony(III) could lead to new metal-based anti-trypanosomal drugs.

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. The thiosemicarbazones were prepared according to standard procedures [10].

Partial elemental analyses were performed on a Perkin–Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000–400 cm^{-1}) and nujol mulls between CsI plates (400–200 cm^{-1}). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO- d_6 as the solvent and TMS as internal reference.

2.2. Syntheses of antimony(III) complexes with *N*(4)-phenyl-2-formylpyridine thiosemicarbazone (*H*2Fo4Ph), *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (*H*2Ac4Ph) and *N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (*H*2Bz4Ph)

The antimony(III) complexes were obtained by mixing an ethanol solution (20 mL) of the desired thiosemicarbazone (1 mmol) with antimony chloride in 1:1 ligand-to-metal molar ratio at room temperature with stirring for 3.5 h. The resulting solids were filtered, washed with ethanol followed by diethyl ether, and dried *in vacuo*.

2.2.1. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-formylpyridinethiosemicarbazonato)-antimony(III) [*Sb*(2Fo4Ph) Cl_2] (**1**)

Yellow solid. *Anal. Calc.* for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SSb}$: C, 34.85; H, 2.47; N, 12.51. Found: C, 34.44; H, 2.38; N, 12.43%. FW: 447.98 g mol^{-1} . IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N–H})$ 3281m, $\nu(\text{C=N})$ 1611s, $\nu(\text{C=S})$ 730m, $\rho(\text{py})$ 622w. IR (CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{Sb–N}_{\text{azometh.}})$ 453m, $\nu(\text{Sb–S})$ 432m,

$\nu(\text{Sb–N}_{\text{py}})$ 225w, $\nu(\text{Sb–Cl})$ 344m. $^1\text{H NMR}$ [200 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] main signals: 10.40 [s, 1H, N(4)H]; 9.09 [d, 1H, H(6)]; 8.09 [d, 1H, H(3)]; 8.31 [t, 1H, H(4)]; 9.16 [s, 1H, H(7)]; 7.11 [t, 1H, H(5)]. $^{13}\text{C NMR}$ [200 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] main signals: 169.12 [C(8)=S]; 151.49 [C(2)]; 147.76 [C(6)]; 140.60 [C(4)]; 141.25 [C(9)]; 145.65 [C(7)=N]; 123.70 [C(5)]; 121.80 [C(3)]. $A_M = 20.15 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 251.9–252.4 °C. Yield 82%.

2.2.2. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato)-antimony(III) [*Sb*(2Ac4Ph) Cl_2] (**2**)

Orange solid. *Anal. Calc.* for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SSb}$: C, 36.40; H, 2.84; N, 12.13. Found: C, 36.20; H, 2.80; N, 12.20%. FW: 461.99 g mol^{-1} . IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N–H})$ 3245m, $\nu(\text{C=N})$ 1596s, $\nu(\text{C=S})$ 753m, $\rho(\text{py})$ 602w. IR (CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{Sb–N}_{\text{azometh.}})$ 505m, $\nu(\text{Sb–S})$ 430m, $\nu(\text{Sb–N}_{\text{py}})$ 222w, $\nu(\text{Sb–Cl})$ 327m. $^1\text{H NMR}$ [200 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] main signals: 10.39 [s, 1H, N(4)H]; 9.09 [d, 1H, H(6)]; 8.80–8.60 [d, 1H, H(3)]; 8.00–7.50 [t, 1H, H(4)]; 2.81 [s, 3H, H(15)]; 7.11 [t, 1H, H(5)]. $^{13}\text{C NMR}$ [200 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] main signals: 167.89 [C(8)=S]; 151.93 [C(2)]; 144.84 [C(6)]; 144.47 [C(7)=N]; 142.22 [C(4)]; 120.85 [C(3)]; 139.77 [C(9)]; 123.53 [C(5)]; 16.93 [C(15)]. $A_M = 22.79 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 237.9–238.8 °C. Yield 95%.

2.2.3. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazonato)-antimony(III) [*Sb*(2Bz4Ph) Cl_2] (**3**)

Complex (**3**) was obtained as previously described Ref. [13].

2.3. Crystallography

Crystals of *H*2Fo4Ph-HCl and complexes (**1a**) and (**2**) suitable for X-ray diffraction were mounted on a glass fiber. Data were collected at room temperature on an Oxford-Diffraction GEMINI diffractometer. Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structures were solved by direct methods and refined on F^2 by full-matrix least-squares using the SHELX-97 [14,15] program in a WinGX system [16]. All hydrogen atoms of *H*2Fo4Ph-HCl could be identified in the Fourier difference map and the refinement results were in good agreement with the expected values. Hence the hydrogen atoms bonded to nitrogens were isotropically refined. Although some of the hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map in the structures of the complexes, in the final model they were geometrically positioned and refined using a riding model. All non-H atoms were refined anisotropically. Molecular graphics and packing figures were obtained from Ortep [17] and Mercury [18], respectively.

2.4. Cytotoxicity and antitrypanosomal activity

2.4.1. Animals

Male BALB/c mice (6–8 weeks old) were raised at the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained at the animal facilities of the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil. All mice were sacrificed and treated in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation Commission for Experiments with Laboratory Animals (Ministry of Health, Brazil, 0266/05).

2.4.2. Obtaining spleen cells

Spleen cells were obtained according to the literature [19]. After euthanizing the animal with CO $_2$ gas, the spleen of each mouse was removed aseptically and placed in Falcon tubes containing RPMI 1640 with 10% of fetal calf serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a Petri dish where they were macerated. The obtained cell suspensions were transferred to Falcon tubes containing approximately 10 mL of incomplete medium,

centrifuged at 4 °C, 200g for 5 min. After discarding the supernatant, distilled water was added to the sediment to promote lysis of red blood cells. The supernatant, containing no cellular debris was collected and centrifuged at 4 °C, 200g for 5 min. The sediment (containing cells) was resuspended in complete RPMI 1640. An aliquot of each cell suspension was separated, diluted in trypan blue to be quantified in a Neubauer chamber and the cell viability was determined.

2.4.3. *In vitro* cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds was determined using BALB/c mice splenocytes (6×10^5 cells well⁻¹) cultured in 96-well plates in RPMI 1640 media (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 50 µg mL⁻¹ of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil). Each compound was evaluated in six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 µg mL⁻¹), in triplicate on two independent assays. Cultures were incubated in the presence of ³H-thymidine (Amersham Biosciences) (1 µCi well⁻¹) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After this period, the content of the plate was harvested to determine the ³H-thymidine ([³H]TdR) incorporation using a beta-radiation counter (β-matrix 9600, Packard). The cytotoxicity of the compounds was determined by comparing the percentage of ³H-thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) of imidazolidines-treated wells in relation to untreated wells. Non-cytotoxic concentrations were defined as those causing a reduction of ³H-thymidine incorporation below 30% in relation to untreated controls.

2.4.4. *T. cruzi* assays

Epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) were cultivated at 26 °C in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% hemin, 1% R9 medium and 50 µg mL⁻¹ gentamycin. Parasites (10⁶ mL⁻¹) were cultured in a fresh medium in the absence or in the presence of the compounds being tested (from stock solution in dimethylsulfoxide, DMSO). Cell growth was determined after 11 days of culture by counting viable forms in a hemacytometer, in triplicate. The compounds used were from a stock solution in DMSO. To determine the IC₅₀, cultures of Y strain epimastigotes in the presence of different concentrations of the compounds were evaluated after 11 days as described above. IC₅₀ calculation was carried out using non-linear regression on PRISM 4.0 GRAPHPAD software. Y strain *T. cruzi* trypomastigotes were obtained from culture supernatants of Vero cell line at 37 °C and placed in 96-well plates (4×10^5 well⁻¹) in a RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 50 µg mL⁻¹ gentamycin. Viable parasites were counted in a hemacytometer 24 h after addition of complexes by way of trypan blue exclusion. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the antimony(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**), in which an anionic thiosemicarbazone is attached to the metal center together with two chloride ions.

3.2. Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to ν(C=N) at 1596 and 1588 cm⁻¹ in the infrared spectra of H2Fo4Ph and H2Ac4Ph, respectively, shift to 1611 and 1596 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1**) and (**2**), in agreement with coordination of the imine nitrogen [13,20–22].

The ν(CS) absorption observed at 774 and 802 cm⁻¹ in the spectra of the free thiosemicarbazones shifts to 730 and 753 cm⁻¹ in the spectra of **1** and **2**, indicating coordination of the sulfur. The 30–50 cm⁻¹ shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [13,20–23]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 600 and 584 cm⁻¹ in the spectra of H2Fo4Ph and H2Ac4Ph, respectively, shifts to 622 and 602 cm⁻¹ in complexes (**1**) and (**2**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [13,20–23].

In the spectra of complexes **1** and **2** the absorptions at 453 and 505 cm⁻¹ and the absorptions at 432 and 430 cm⁻¹ were attributed to the ν(Sb–N_{imine}) and ν(Sb–S) vibrations, respectively, and those at 225 and 222 cm⁻¹ to ν(Sb–N_{py}) vibrations [13,20–23]. Therefore in the complexes the thiosemicarbazones are attached to the metal through the N_{py}–N–S chelating system. One absorption attributed to ν(Sb–Cl) at 344 and 327 cm⁻¹ was observed in the spectra of **1** and **2**, respectively [24].

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C and CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signals of all hydrogens and carbons are duplicated in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the thiosemicarbazones, indicating the presence of the *Z* and *E* configurational isomers in solution. In the first N(3)–H is hydrogen bonded to the hetero-aromatic nitrogen while in the second N(3)–H is hydrogen bonded to the solvent [13,20–23]. The signal of N(3)–H at δ 14.43 and 12.04 ppm (H2Fo4Ph) and δ 14.16 and 10.61 ppm (H2Ac4Ph) were attributed to the *Z* and *E* isomers respectively [13,20–23]. The *E* isomer corresponds to 96% and 88% for H2Fo4Ph and H2Ac4Ph, respectively.

In the ¹H and ¹³C NMR spectra of complexes (**1–2**) only one signal was observed for each hydrogen and each carbon. The absence of the N(3)–H signal indicates coordination of an anionic thiosemicarbazone. The signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free bases. Similarly, the signals of C=N, C=S and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination of the thiosemicarbazones through the N_{py}–N–S chelating system (see Fig. 2), with adoption of the *EZ* conformation in relation to the C7–N2 and N3–C8 bonds [13,20–23].

3.3. X-ray diffraction analysis

Crystals of H2Fo4Ph·HCl were obtained from the filtrate in the syntheses of complex (**1**). Crystals of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) were obtained upon dissolution of **1** and **2**, respectively, in DMSO.

Crystals' data, data collection procedures, structures' determination methods and refinement results are summarized in Table 1.

Figs. 3 and 4 are perspective views of H2Fo4Ph·HCl and complexes [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**). Selected intra-molecular bond distances and angles for H2Fo4Ph·HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**), H2Ac4Ph [25], [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] [13] are given in Tables 2 and 3. Molecular structures of H2Ac4Ph and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] have been determined previously [25,13].

The pyridine nitrogen in H2Fo4Ph·HCl is protonated. The cation adopts the *EE* conformation. The molecular packing of H2Fo4Ph·HCl (Fig. 5) reveals that the three N–H...Cl hydrogen bonds give rise to a polymeric structure. The distances and angles observed for H2Fo4Ph·HCl and H2Ac4Ph are very similar (see Tables 2 and 3). H2Ac4Ph adopts the *EE* conformation too, with two weak in-

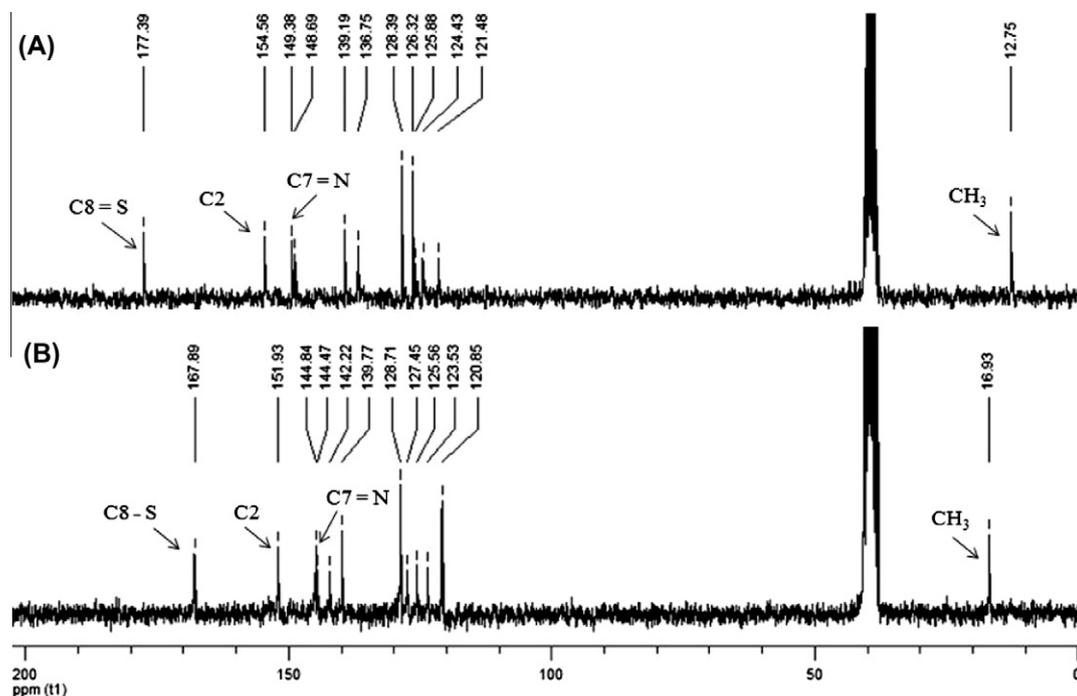


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$ (A) and $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**2**) (B).

Table 1

Crystal data and refinement results for $\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}\cdot\text{HCl}$, $[\text{Sb}(\text{2Fo}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]\cdot 2\text{DMSO}$ (**1a**) and $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**2**).

Compound	$\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}\cdot\text{HCl}$	$[\text{Sb}(\text{2Fo}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]\cdot 2\text{DMSO}$ (1a)	$[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (2)
Empirical formula	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_3\text{Sb}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SSb}$
Formula weight	292.78	598.18	461.99
T (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	orthorhombic	monoclinic	orthorhombic
Space group	$Pca2(1)$	$P2(1)/c$	$Pbca$
a (Å)	7.6886(2)	12.1753(2)	8.2897(2)
b (Å)	13.9347(4)	21.6284(3)	14.7600(4)
c (Å)	13.0320(3)	9.25140(10)	27.7114(9)
β (°)	90	90.7200(10)	90
V (Å ³)	1396.23(6)	2436.00(6)	3397.66(17)
Z	4	4	8
D_{calc} (Mg/m ³)	1.393	1.631	1.810
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.414	1.629	2.066
$F(0\ 0\ 0)$	608	1184	1808
Crystal size	$0.19 \times 0.14 \times 0.08$	$0.20 \times 0.14 \times 0.10$	$0.28 \times 0.14 \times 0.10$
θ Range (°)	2.92–26.37	2.90–26.37	2.76–26.37
Index ranges	$-7 \leq h \leq 10$ $-19 \leq k \leq 13$ $-17 \leq l \leq 15$	$-15 \leq h \leq 14$ $-25 \leq k \leq 27$ $-11 \leq l \leq 11$	$-10 \leq h \leq 10$ $-18 \leq k \leq 18$ $-34 \leq l \leq 34$
Reflections collected/unique (R_{int})	5256/2710(0.0200)	26,422/4978(0.0273)	36,227/3477(0.0504)
Data completeness to $\theta = 26.37$	99.9 %	99.9 %	100%
Absorption correction	semi-empirical from equivalents	semi-empirical from equivalents	semi-empirical from equivalents
Data/restraints/parameters	2710/1/184	4978/6/294	3477/0/200
Absolute structure parameter	0.04(5)		
Goodness-of-fit (GOF) on F^2	0.918	1.053	1.002
Final R indices ($I > 2\sigma(I)$)	$R_1 = 0.0256$ $wR_2 = 0.0522$	$R_1 = 0.0223$ $wR_2 = 0.0615$	$R_1 = 0.0265$ $wR_2 = 0.0590$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0346$ $wR_2 = 0.0537$	$R_1 = 0.0314$ $wR_2 = 0.0630$	$R_1 = 0.0424$ $wR_2 = 0.0625$
Largest difference in peak and hole (e Å ⁻³)	0.119 and -0.114	0.427 and -0.299	1.040 and -0.415

ter-molecular $\text{N}(3)\text{--H}\cdots\text{S}(1)$ hydrogen bonds forming a dimer [25].

In complexes (**1a**) and (**2**) Sb(III) is coordinated by a tridentate anionic ligand and two chloride ions in a distorted square pyramidal environment. The $\text{N}(1)\text{--Sb}(1)\text{--S}(1)$ (ca. 145°) and the $\text{Cl}(2)\text{--Sb}(1)\text{--Cl}(1)$ (ca. 162.8°) angles from the base deviate markedly

from the ideal value of 180° in both complexes. The same distortion was found in $[\text{Sb}(\text{2Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**) [13]. Some differences observed for **3** could be due to the different temperatures of measurement, 120 K for **3** and 293 K for complexes (**1a**) and (**2**). However, this difference seems not to significantly modify the results. The distances and angles of all three antimony complexes are

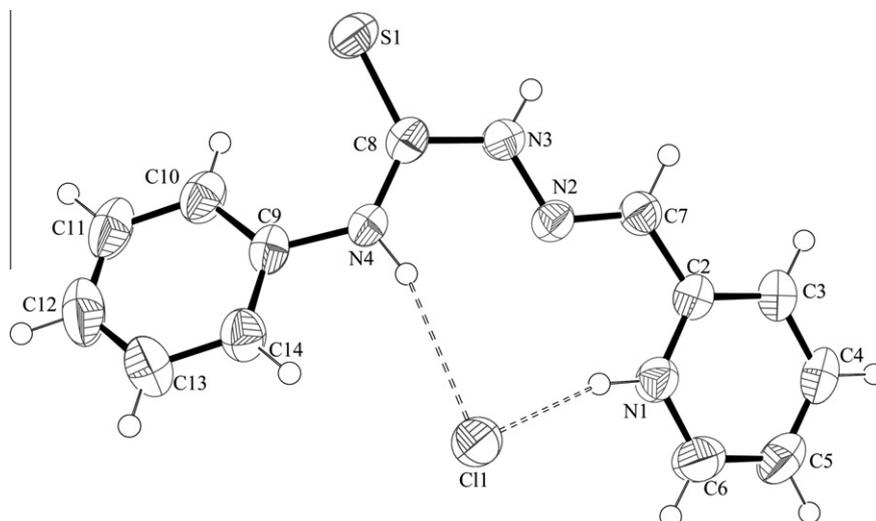


Fig. 3. Molecular plot of H2Fo4Ph-HCl showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

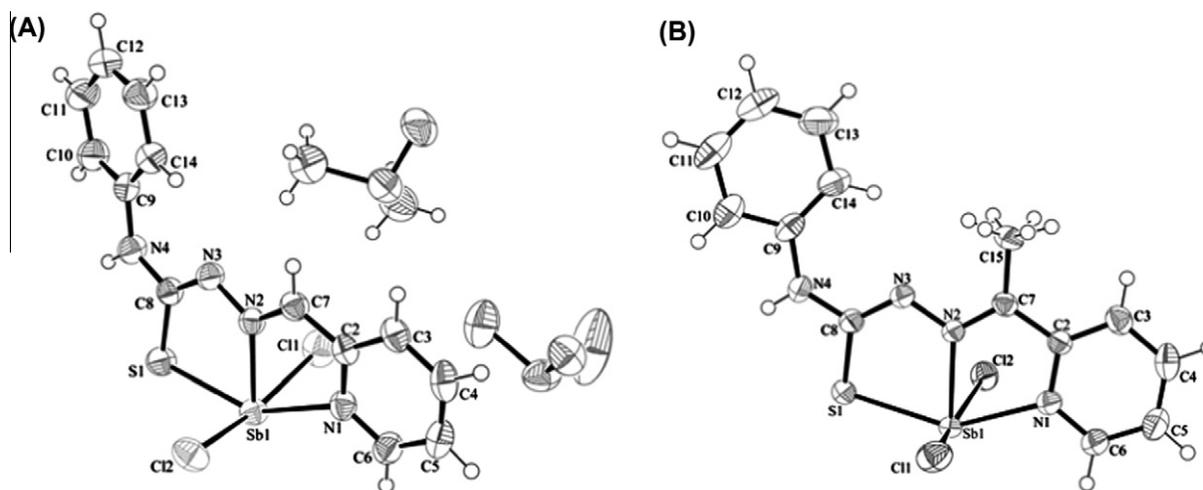


Fig. 4. Molecular plot of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**, A) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**, B) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 2

Selected bond lengths for H2Fo4Ph-HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**), H2Ac4Ph, [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**).

Atoms	Bond lengths (Å)				
	H2Fo4Ph-HCl	[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂].2DMSO (1a)	H2Ac4Ph[25] ^a	[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂][13] (3) ^a
Sb(1)–N(2)		2.247(2)		2.234(2)	2.252(3)
Sb(1)–N(1)		2.502(2)		2.356(3)	2.308(3)
Sb(1)–Cl(1)		2.5788(7)		2.5335(9)	2.5286(12)
Sb(1)–Cl(2)		2.5835(7)		2.6252(9)	2.6114(12)
Sb(1)–S(1)		2.5066(6)		2.5333(8)	2.5733(10)
S(1)–C(8)	1.665(2)	1.741(2)	1.677(2)	1.749(3)	1.725(4)
N(1)–C(6)	1.332(3)	1.324(3)	1.339(3)	1.329(4)	1.330(6)
N(1)–C(2)	1.341(2)	1.347(3)	1.334(2)	1.342(4)	1.341(6)
N(3)–C(8)	1.368(2)	1.318(3)	1.358(3)	1.308(4)	1.311(5)
N(2)–C(7)	1.281(2)	1.288(3)	1.284(3)	1.298(4)	1.301(5)
N(2)–N(3)	1.359(2)	1.371(3)	1.376(2)	1.367(3)	1.368(4)

^a Numbering of some atoms in the published structure was modified in order to make discussion easier.

very similar (see Tables 2 and 3). Fig. 6 shows the weak interactions between Sb(III), N(4)–H and the O atoms of the solvent for [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**).

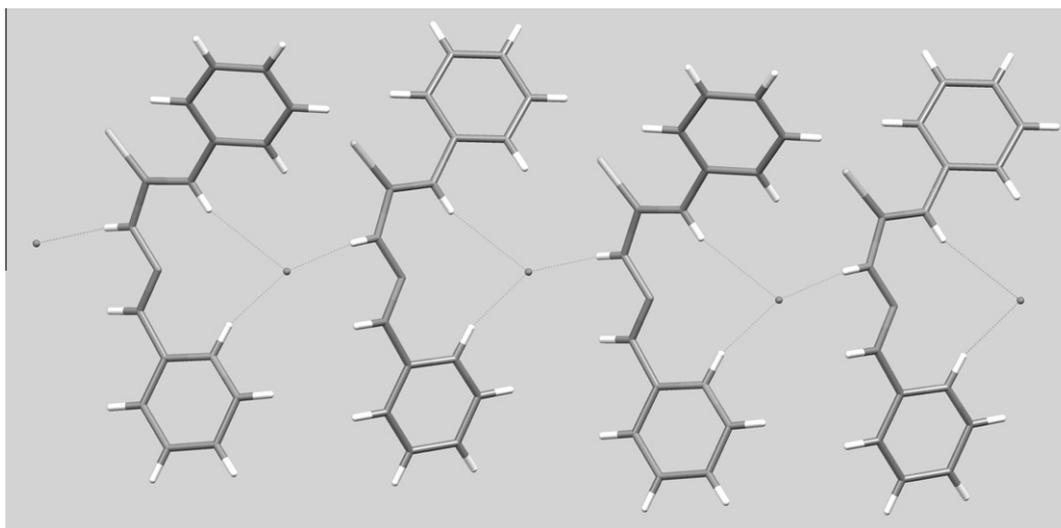
The molecular packing of [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) (see Fig. 7) reveals that an inter-molecular short-contact occurs between Sb(III) and Cl(2) (sum of van der Waals radii less 0.3 Å) which gives rise to a

pseudo-octahedral environment. In this case the short-contact between Sb(III) and Cl(2) together with the N(4)–H hydrogen bond give rise to a tri-dimensional network (see Table 4).

In the complexes the expected lengthening of the C(8)–S(1) bonds from 1.665(2) Å in H2Fo4Ph-HCl to 1.741(2) Å in **1a** and from 1.677(2) Å in H2Ac4Ph [25] to 1.749(3) Å in **2**, together with

Table 3Selected bond angles for H₂Fo4Ph·HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]-2DMSO (**1a**), H₂Ac4Ph, [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**).

Atoms	Angle (°)				
	H ₂ Fo4Ph·HCl	[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]-2DMSO (1a)	H ₂ Ac4Ph[25]	[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂][13] (3)
N(2)–Sb(1)–N(1)		68.80(6)		69.40(9)	70.31(12)
N(1)–Sb(1)–Cl(2)		83.97(5)		83.45(7)	
N(1)–Sb(1)–S(1)		145.08(5)		145.73(6)	144.82(10)
N(2)–Sb(1)–Cl(1)		79.92(5)		84.43(7)	
Cl(2)–Sb(1)–Cl(1)		162.82(3)		162.78(3)	158.55(4)
N(2)–Sb(1)–Cl(2)		83.84(5)		81.40(7)	83.26(9)
N(2)–Sb(1)–S(1)		76.40(5)		76.47(6)	74.51(8)
Cl(2)–Sb(1)–S(1)		89.69(2)		91.36(3)	
N(1)–Sb(1)–Cl(1)		84.96(5)		82.44(7)	
S(1)–Sb(1)–Cl(1)		91.90(2)		94.77(3)	
N(1)–C(2)–C(7)	118.55(16)	115.9(2)	116.21(3)	114.6(3)	115.3(3)
C(2)–C(7)–N(2)	118.68(16)	120.7(2)	114.93(2)	116.8(3)	117.4(4)
C(7)–N(2)–N(3)	116.98(15)	115.3(2)	118.8(2)	115.9(2)	115.4(3)
C(8)–N(3)–N(2)	121.31(16)	115.7(2)	118.9(2)	116.7(2)	116.0(3)
N(3)–C(8)–S(1)	116.59(14)	126.2(2)	119.7(1)	126.1(2)	126.1(3)
S(1)–C(8)–N(4)	127.86(13)	115.1(2)	125.5(2)	115.1(2)	115.6(3)
N(3)–C(8)–N(4)	115.69(14)	118.8(2)	114.8(2)	118.8(3)	118.2(3)
C(8)–N(4)–C(9)	128.77(15)	130.2(2)	127.6(2)	129.9(3)	130.2(4)

**Fig. 5.** Molecular packing of H₂Fo4Ph·HCl.

the shortening of the N(3)–C(8) bonds from 1.368(2) Å in H₂Fo4Ph·HCl to 1.318(3) Å in **1a** and 1.358(3) Å in H₂Ac4Ph to 1.308(4) Å in **2**, were observed. Therefore, the C(8)–S(1) bond changes from a double to a predominantly single bond whereas N(3)–C(8) acquires some double bond character.

The bond distances between antimony and the imine nitrogen, 2.247(2) Å in **1a** and 2.234(2) Å in **2**, are shorter than the distance between antimony and the pyridine nitrogen, 2.502(2) Å in **1a** and 2.356(3) Å in **2**. In **2** the Sb(1)–Cl(1) bond is shorter than the Sb(1)–Cl(2) bond probably due to the presence of a short-contact interaction between Cl(2) from one molecule and the antimony of a neighbor molecule (see Table 2 and Fig. 7).

A twisting of approximately 180° in the N(3)–C(8) bond of the thiosemicarbazones to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Hence, some angles undergo significant changes on complexation. The C(8)–N(3)–N(2) angle goes from 121.31(16)° in H₂Fo4Ph·HCl to 115.7(2)° in **1a** and from 118.9(2)° in H₂Ac4Ph [25] to 116.7(2)° in **2**; N(3)–C(8)–S(1) goes from 116.59(14)° in H₂Fo4Ph·HCl to 126.2(2)° in **1a** and 119.7(1)° in H₂Ac4Ph [25] to 126.1(2)° in **2**; N(4)–C(8)–S(1) varies

from 127.86(13)° in the free base to 115.1(2)° in **1a** and 125.5(2)° in H₂Ac4Ph [25] to 115.1(2)° in **2**.

3.4. Antitrypanosomal activity

Table 5 reports the cytotoxicities and the IC₅₀ values for growth inhibition induced by the studied compounds, on trypomastigote and epimastigote forms of *T. cruzi*. Dose–response curves were obtained in all cases but in some cases we were unable to determine the IC₅₀ values.

H₂Fo4Ph proved to be highly cytotoxic. We could not determine its IC₅₀ value against both forms of the parasitic cycle. Its antimony(III) complex (**1**) exhibited growth inhibition activity against both trypomastigote and epimastigote forms of *T. cruzi* with similar values of IC₅₀ (1.2 μM), which were lower than the IC₅₀ determined for benzimidazole and nifurtimox against both forms. However it revealed to be cytotoxic at approximately the same dose (~1 μM).

H₂Ac4Ph was active against the epimastigote form at high doses (IC₅₀ = 52.8 μM), being cytotoxic at concentrations lower than 1 μM. Complex (**2**) was active at low doses (IC₅₀ = 1.23 μM)

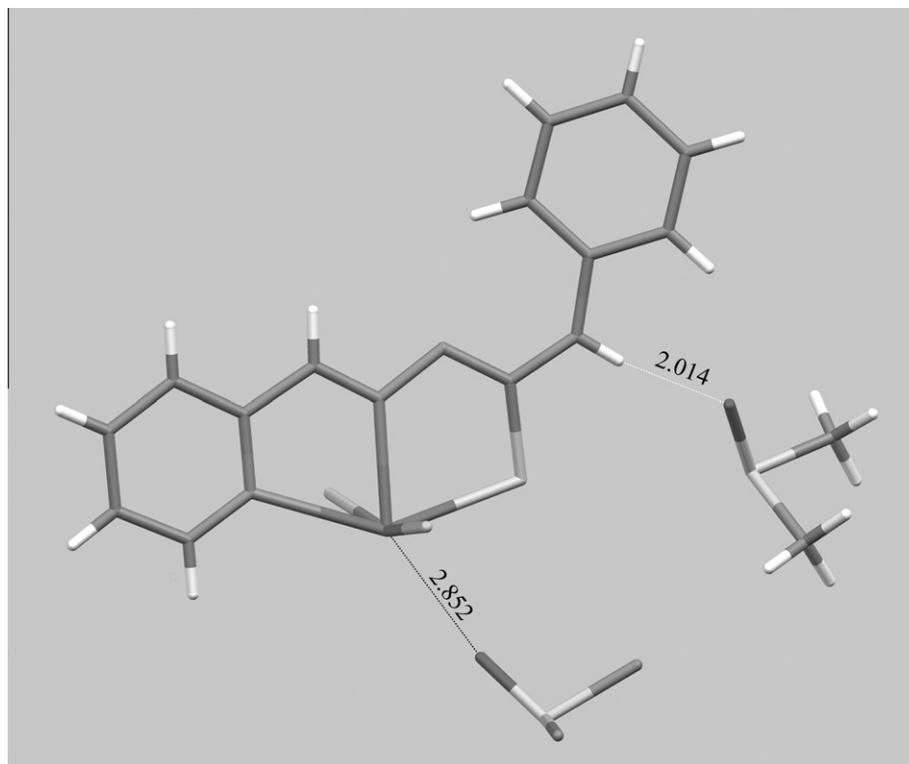


Fig. 6. Short-contacts of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]·2DMSO (**1a**).

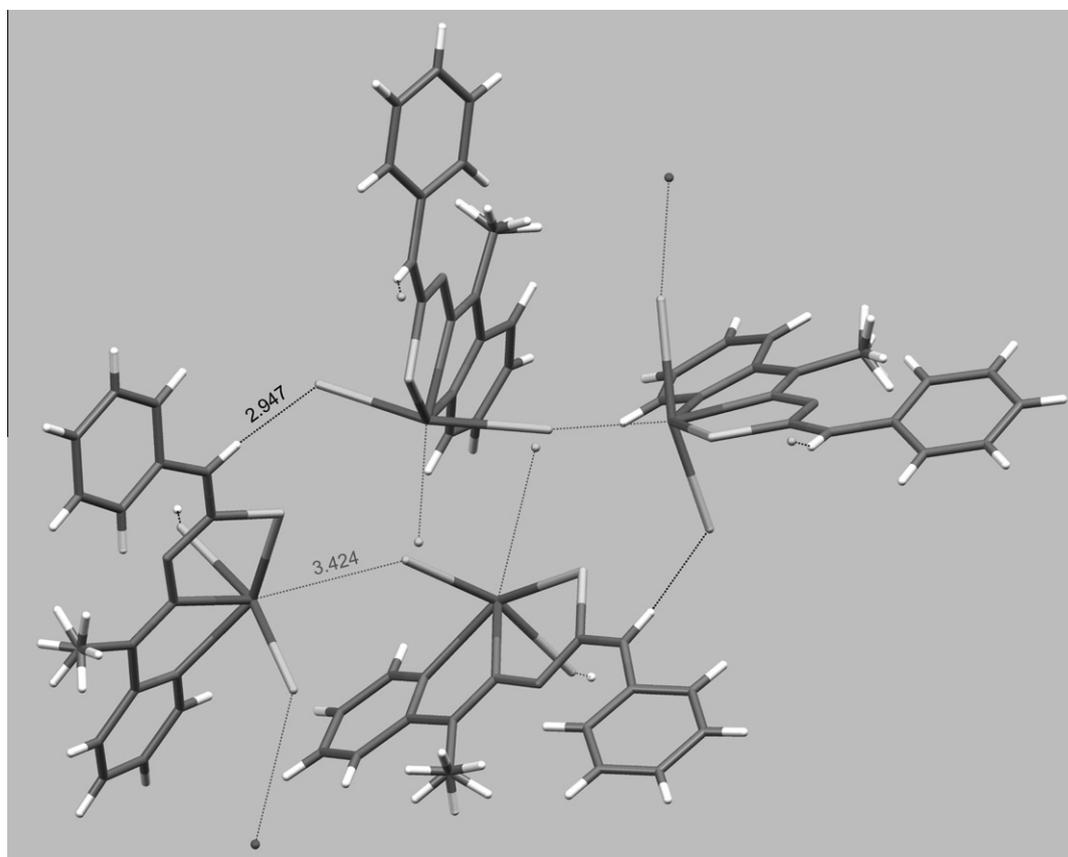


Fig. 7. Molecular packing of [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**).

Table 4Hydrogen bonds distances (Å) and angles (°) for H₂Fo4Ph-HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]-2DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**).

	D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	(D–H...A)	Symmetry operation ^a
H ₂ Fo4Ph-HCl	N(3)–H(3A)···Cl(1)	0.81(2)	2.45(2)	3.2572(18)	171.6(17)	[–x + 3/2, y, z – 1/2]
	N(4)–H(4A)···Cl(1)	0.884(18)	2.641(19)	3.4904(16)	161.4(15)	intra-molecular
	N(1)–H(1A)···Cl(1)	0.92(2)	2.13	3.0125(16)	161.1(18)	intra-molecular
[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]-2DMSO (1a)	N(4)–H(4A)···O(3A)	0.86	2.014	2.850(3)	163.8	[x, y, z + 1]
[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	N(4)–H(4A)···Cl(1)	0.86	2.54	3.314(3)	150.5	[–x + 1/2, y – 1, z]

^a The symmetry transformations used to generate equivalent atoms are bracketed.**Table 5**Antitrypanosomal activity of H₂Fo4Ph, H₂Ac4Ph and H₂Bz4Ph, their Sb(III) complexes, antimony chloride and the reference compounds benznidazole (bnz) and nifurtimox (nfx).

Compound	Cytotoxicity ^b (μmol L ⁻¹)	IC ₅₀ trypano ^a (μmol L ⁻¹)	IC ₅₀ epi ^a (μmol L ⁻¹)
H ₂ Fo4Ph	<1	ND	ND
[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1)	<1	1.27	1.23
H ₂ Ac4Ph	<1	ND	52.78
[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	<1	1.23	ND
H ₂ Bz4Ph	<3.00	14.41	ND
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	<1.91	8.39	2.10
SbCl ₃	<4.38	65.75	6.79
bnz	96.06	6.26	6.65
nfx	3.48	2.75	1.88

bnz = benznidazole; nfx = nifurtimox; ND = not determined; ND (“Not Determined”): data of activity were acquired in a dose–response curve but no linear regression was obtained from the curves.

^a Calculated at seven concentrations using data obtained from at least three independent experiments, with a SD less than 10% in all cases.^b Expressed as the highest concentration tested that was not cytotoxic for the BALB/c mice splenocytes. Calculated at six concentrations using data obtained from at least three independent experiments, with a SD less than 10% in all cases. Values in M are showed in parentheses.

against the bloodstream trypomastigote form, being more active than both nifurtimox and benznidazole. Nevertheless it proved to be cytotoxic at doses lower than 1 μM.

H₂Bz4Ph was moderately active against the infecting trypomastigote form (IC₅₀ = 14.41 μM) while its cytotoxicity was lower than those of all other thiosemicarbazones. Complex (**3**) proved to be more active against the epimastigote (IC₅₀ = 2.10 μM) than against the trypomastigote form (IC₅₀ = 8.39 μM); its cytotoxicity was the lowest among all ligands and complexes.

The antimony salt SbCl₃ was more active against the proliferative epimastigote form than against the trypomastigote form, but high doses were required for the inhibition of trypomastigotes' growth. As a consequence, its cytotoxicity was the lowest among all studied compounds.

The antimony complexes proved to have antitrypanosomal activity. In all cases activity is higher than that of the starting salt. Complexes (**1**) and (**2**) were more active than the reference drugs nifurtimox and benznidazole. However the studied compounds did not reveal to be good as antitrypanosomal drug candidates mainly due to their cytotoxicities. It is worth mentioning that the determined values of IC₅₀ for nifurtimox demonstrated that it was more active against the more susceptible epimastigote form and that its cytotoxic effects occur at doses slightly higher to those effective in the inhibition of the parasite growth.

4. Conclusions

The antimony(III) complexes presented antitrypanosomal activity against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*. Some of the compounds exhibited higher activity than the reference drugs nifurtimox and benznidazole. However the studied

compounds presented cytotoxicity at doses lower than their IC₅₀ values, suggesting that they are not good as new antitrypanosomal drug candidates.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and INCT-INOFAR, Proc. CNPq 573.364/2008-6).

Appendix A. Supplementary data

CCDC 791172, 791170 and 791171 contain the supplementary crystallographic data for H₂Fo4Ph-HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]-2DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/contents/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

- M. Boiani, L. Boiani, A. Merlino, P. Hernández, A. Chidichimo, J.J. Cazzulo, H. Cerecetto, M. González, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 4426.
- A. Gerpe, G. Álvarez, D. Benítez, L. Boiani, M. Quiroga, P. Hernández, M. Sortino, S. Zacchino, M. González, H. Cerecetto, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7500.
- M. Cabrera, M.L. Lavaggi, P. Hernández, A. Merlino, A. Gerpe, W. Porcal, M. Boiani, A. Ferreira, A. Monge, A.L. Cerain, M. González, H. Cerecetto, Toxicol. Lett. 190 (2009) 140.
- S.A. Dzamitika, C.A.B. Falcão, F.B. Oliveira, C. Marbeuf, A. Garnier-Suillerot, C. Demicheli, B. Rossi-Bergmann, F. Frézard, Chem. Biol. Interact. 160 (2006) 217.
- H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem. 4 (2004) 31.
- D.C. Greenbaum, Z. Mackey, E. Hansell, P. Doyle, J. Gut, C.R. Caffrey, J. Lehrman, P.J. Rosenthal, J.H. McKerrow, K. Chibale, J. Med. Chem. 47 (2004) 3212.
- S.P. Fricker, R.M. Mosi, B.R. Cameron, I. Baird, Y. Zhu, V. Anastassov, J. Cox, P.S. Doyle, E. Hansell, G. Lau, J. Langille, M. Olsen, L. Qin, R. Skerlj, R.S.Y. Wong, Z. Santucci, J.H. McKerrow, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 1839.
- I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263.
- I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571.
- J.G. Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301.
- A.P. Rebollo, L.R. Teixeira, A.A. Batista, A.S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, P. Hernández, A.M. Ferreira, N.L. Speziali, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 939.
- C. Rodrigues, A.A. Batista, J. Ellena, E.E. Castellano, D. Benítez, H. Cerecetto, M. González, L.R. Teixeira, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2847.
- D.C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M.S. Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 3904.
- G.M. Sheldrick, SHELXS-97: Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- G.M. Sheldrick, SHELXL-97: Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- L.J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 837.
- L.J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 30 (1997) 565.
- I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M.K. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, Acta Crystallogr. B58 (2002) 389.
- V.R.A. Pereira, V.M.B. Lorena, A.P.G. Silva, E.M. Coutinho, E.D. Silva, A.G.P. Ferreira, P. Miranda, M.A. Krieger, S. Goldenberg, M.B.P. Soares, R. Correa-Oliveira, Y.M. Gomes, Parasitology 129 (2004) 563.
- A.P. Rebollo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M.S. Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698.
- A.E. Graminha, C. Rodrigues, A.A. Batista, L.R. Teixeira, E.S. Fagundes, H. Beraldo, Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 69 (2008) 1073.

- [22] A.P. Rebollo, G.M. Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 945.
- [23] R.F.F. Costa, A.P. Rebollo, T. Matencio, H.D.R. Calado, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, *J. Coord. Chem.* 58 (2005) 1307.
- [24] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, second ed., Wiley-Interscience, New York, 1970.
- [25] E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D.X. West, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 625 (1999) 961.



Lucas Ferreira da Rocha is a technician and works at the Immunogenetics Laboratory, Immunology Department of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, Brazil. He carries on immunomodulation assays and evaluation of anti-parasitic activities of natural and synthetic compounds.



Josane A. Lessa received her BSc degree in Chemistry from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro (2006). She earned her Master's Degree in Natural Sciences from the same institution (2008). Currently, she is a PhD student in Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Her scientific interests involve Medicinal Inorganic Chemistry and Coordination Chemistry. Her experiences are based on design and syntheses of bioactive organic molecules and their metal complexes, and evaluation of antimicrobial activities.



Valeria R.A. Pereira received her PhD (2003) in Cellular and Molecular Biology from Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Brazil. She is currently a researcher at the Department of Immunology in Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ)-Recife, Brazil, and develops researches that include: *in vitro* studies of immunomodulatory and anti-parasitic activities of synthetic chemicals and natural products against *T. cruzi* and *Leishmania spp.*; and studies in experimental and human immunoparasitology of Chagas disease and Leishmaniasis (L), to determine the cellular immune response profile in parasite-specific peripheral blood from patients with active L and after clinical cure.



Débora Costa Reis earned her BSc degree in Chemistry from Universidade Federal de Uberlândia, Brazil (2004). She earned a Master's Degree in Chemistry from Universidade Federal de Minas Gerais (2006) with emphasis in Natural Products Chemistry. She is currently a PhD student at Universidade Federal de Minas Gerais with emphasis in Medicinal Inorganic Chemistry. Her experience involves the syntheses and investigation of the pharmacological profile of bioactive molecules and their metal complexes.



Cristiane M.L. Melo earned her BSc. degree in Biological Sciences (2004) from Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. She received her Master's Degree (2007) in Biological Sciences with emphasis on Biotechnology and a PhD degree (2009) in Biological Science with emphasis in Immunology both from Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. She is presently a visiting researcher at Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, Brazil. She has experience in Cellular Biology and her studies involve immunology, parasitology, histology and pathology.



Isolda C. Mendes received her B.Sc. (1998) and Ph.D. (2007) in Chemistry from Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. She has experience in Inorganic Chemistry, Bio-Inorganic Chemistry and Scientific Conservation of Art Objects, Archaeological Sites, and Monuments. She carries on research in X-rays diffraction and fluorescence, crystal structure determination, coordination chemistry, and deterioration mechanisms of art objects. Member of the Brazilian Chemical Society, the Brazilian Association of Crystallography and the International Council of Museums - ICOM. Now working at the School of Fine Arts of Universidade Federal de

Minas Gerais, Brazil, as conservation scientist.



Heloisa Beraldo received her PhD degree (Docteur d'État ès Sciences Physiques) from Université Paris VI (1984). She is presently Professor of Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Her research interests are centered on Inorganic Medicinal Chemistry, with emphasis on metal-based drugs design, and the effects of metal coordination on the pharmacological profile of organic compounds, antimicrobials, cytotoxic/antitumoral agents and anti-inflammatory agents.



Nivaldo Speziali received his PhD degree (Docteur ès Sciences) from Université de Lausanne, Switzerland (1989). He is presently Associate Professor of Physics at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil; Head of the Laboratory of Crystallography - UFMG; President of the Brazilian Crystallographic Association. Scientific interests in X-ray diffraction (single and polycrystals); structural of solids, thermotropic phase transitions, aperiodic systems, modulated phases, magnetic materials, coordination compounds.