

**Complexos metálicos de hidrazonas,
tiosemicarbazonas e lapachol: atividade
farmacológica e avaliação de relações
estrutura-atividade**

Gabrieli Lessa Parrilha

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Gabrieli Lessa Parrilha

**Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e
lapachol: atividade farmacológica e avaliação de relações
estrutura-atividade**

Belo Horizonte

2012

UFMG-ICE_x/DQ - 881^a

T. 382^a

Gabrieli Lessa Parrilha

**Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e
lapachol: atividade farmacológica e avaliação de relações
estrutura-atividade**

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

Belo Horizonte-MG-Brasil

2012

Parrilha, Gabrieli Lessa

P261 Complexos metálicos de hidrazonas,
2012 tiossemicarbazonas e lapachol: atividade farmacológica
T e avaliação de relações estrutura-atividade./ Gabrieli
Lessa Parrilha. 2012.

xx: 154f. : il

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo

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

Bibliografia

1.Química Inorgânica - Teses 2. Atividade
farmacológica - Teses 3.Complexos metálicos - Teses
4. Estudos SAR - Teses I.Beraldo, Heloisa de
Oliveira, Orientador II.Título.

CDU 043



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



**"Complexos Metálicos de Hidrazonas, Tiossemicarbazonas e Lapachol:
Atividade Farmacológica e Avaliação de Relações Estrutura-Atividade"**

Gabrieli Lessa Parrilha

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG

Adolfo Horn Jr

Prof. Adolfo Horn Júnior
UENF

Julio Santos Rebouças

Prof. Julio Santos Rebouças
UFPB

Gilmar Pereira de Souza

Prof. Gilmar Pereira de Souza
UFOP

Leticia R. S. Teixeira

Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira
UFMG

Geraldo Magela de Lima

Prof. Geraldo Magela de Lima
UFMG

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2012.

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

Esse trabalho é dedicado aos meus queridos pais que, apesar da distância, sempre estiveram presentes na vida. Obrigada pelo apoio e dedicação!

Agradecimentos

- À Deus, meu amado Pai, que me sustentou e fortaleceu todos os dias, tornando possível a conclusão desse trabalho.
- À Prof^a. Heloisa pela orientação, dedicação, apoio e paciência durante esses quatro anos.
- Aos meus queridos pais, que me deram todo o apoio necessário, obrigada pelo investimento e amor dedicados a mim.
- Aos meus queridos irmãos e sobrinhos pelo carinho, incentivo e apoio.
- Aos meus familiares que sempre me ajudaram e incentivaram. Obrigada por tudo!
- Aos meus amigos que, embora longe, estão sempre presentes na minha vida.
- Às amigas Beatriz, Fabiane e Sara pelo carinho, paciência e longas conversas durante esses anos.
- Aos colegas de laboratório, em especial, Angel, Débora, Jeferson, Josane, Karina e Rafael pela amizade, ajuda e carinho demonstrados no dia-a-dia.
- Aos pesquisadores Dr^a. Isolda Maria Castro Mendes, Dr^a. Lucienir Duarte, Dr^a. Gracia Divina de Fátima Silva, Dr. Willian Rocha, Dr. Nivaldo Speziali, Dr. Oscar Piro, Dr. Eduardo Castellano, Dr. Daniel de Assis Santos, Dr^a. Silvia Passos Andrade, Dr. Eliezer Barreiro, Dr. Hugo Cerecetto, Dr^a. Valéria Rêgo Alves Pereira, Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira, Dr^a. Raquel Gouveia dos Santos e Dr^a. Antoniana Ursine Krettli pela colaboração na realização deste trabalho.
- Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, Paulete, Lilian e Kátia. Obrigada pelo carinho, atenção e boa vontade.
- Aos professores e colegas do Departamento de Química pela amizade, ajuda e boa convivência ao longo dos anos.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Resumo

O presente trabalho consistiu na obtenção e caracterização de compostos metálicos com ligantes bioativos, visando o estudo destes compostos frente a diferentes sistemas biológicos. Então, foram planejados candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiparasitários e antitumorais.

O complexo $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$ foi obtido com salicilaldeído-2-clorobenzoil hidrazona ($H_2LASSBio-466$), enquanto $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$ e $[Zn(LASSBio-1064)]_2$ foram obtidos com salicilaldeído-4-clorobenzoil hidrazona ($H_2LASSBio-1064$). Os compostos foram avaliados em modelos animais de nocicepção central e periférica e de inflamação aguda. A constrição animal induzida por ácido acético foi fortemente inibida por todos os compostos estudados. Após a coordenação, a atividade antinociceptiva foi favorecida pelo complexo $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$. $H_2LASSBio-466$ inibiu apenas a primeira fase dos ensaios de nocicepção induzida por formaldeído, enquanto seu complexo $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$ foi ativo na segunda fase, indicando sua habilidade de induzir nocicepção associada com resposta inflamatória. $H_2LASSBio-1064$ inibiu ambas as fases, mas este efeito não foi melhorado após a coordenação. Todos os compostos mostraram níveis de inibição de peritonite induzida por zimosano comparáveis ou superiores à indometacina, indicando um expressivo perfil anti-inflamatório.

Foram obtidos seis complexos de gálio com 2-acetilpiridina-fenil hidrazona (H_2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenil hidrazona ($H_2AcpClPh$), 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenil hidrazona (H_2AcpNO_2Ph) e com as correspondentes hidrazonas derivadas 2-benzoilpiridina (H_2BzPh , $H_2BzpClPh$ e H_2BzpNO_2Ph): $[Ga(2AcPh)_2]NO_3 \cdot H_2O$, $[Ga(2AcpClPh)_2]NO_3 \cdot H_2O$, $[Ga(2AcpNO_2Ph)_2]NO_3 \cdot 1,5H_2O$, $[Ga(2BzPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$, $[Ga(2BzpClPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ e $[Ga(2BzpNO_2Ph)_2]NO_3 \cdot H_2O$.

As hidrazonas e seus complexos de gálio não apresentaram atividade significativa contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antifúngica de alguns compostos foi similar à do fluconazol contra *Candida albicans*. A complexação reduziu significativamente os valores de concentração inibitória mínima (CIM) sendo o melhor resultado observado para o complexo $[Ga(2AcpClPh)_2]NO_3 \cdot H_2O$.

A $1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, as hidrazonas e seus complexos de gálio(III) mostraram atividade citotóxica contra células de glioblastoma U87 (que expressam a proteína pro-apoptótica p53) e T98 (que expressam a proteína p53 mutante). Em alguns casos, a complexação promoveu um

aumento da atividade contra as células testadas. Valores de IC₅₀ foram obtidos para as hidrazonas, mas não para seus complexos de gálio(III), devido à sua baixa solubilidade. As hidrazonas foram fortemente citotóxicas, apresentando atividade a doses nanomolares contra as células U87 e T98. Exceto H2Bz₄pNO₂Ph, todas as hidrazonas foram mais potentes que o etoposídeo. Estudos SAR sugerem que propriedades estéreo-eletrônicas influenciam na atividade citotóxica das hidrazonas contra as células de glioblastoma estudadas.

As hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III) também tiveram sua atividade antimalárica avaliadas. As hidrazonas foram muito ativas contra *Plasmodium falciparum* e apresentaram baixa toxicidade contra células de hepatoma humano. A coordenação não fez aumentar a atividade antimalárica e resultou em um aumento da citotoxicidade

Os complexos [Ga(Lp)]H₂O e [Bi(Lp)₂]Cl (Lp = lapacholato) foram obtidos com 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, lapachol. A atividade antiangiogênica dos compostos foi investigada utilizando-se um modelo animal de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja. Apenas o complexo de bismuto(III) reduziu estatisticamente a quantidade de hemoglobina nos implantes após tratamento *per os* utilizando doses de lapachol de 25 mg/Kg/dia (e doses equivalentes dos demais compostos). Após administração i.p., tanto o lapachol quanto seu complexo de bismuto reduziram a neovascularização dos implantes. Neste caso, nenhuma diferença estatística foi verificada entre os grupos lapachol e [Bi(Lp)₂]Cl. Da mesma forma, a atividade de *N*-acetil-glicosaminidase (NAG) foi reduzida apenas pelo complexo de bismuto(III) no tratamento *per os*, enquanto no tratamento i.p. a inibição da atividade foi observada para lapachol e o complexo [Bi(Lp)₂]Cl. Esses resultados sugerem que a atividade do complexo [Bi(Lp)₂]Cl é atribuída ao ligante lapachol e que a coordenação ao bismuto foi uma boa estratégia para melhorar os efeitos terapêuticos do lapachol após a administração *per os*.

Complexos de antimônio(III) foram obtidos com 2-acetilpiridina-*N*(4)-*o*-clorofenil tiossemicarbazona (H2Ac4_oClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*o*-fluorfenil tiossemicarbazona (H2Ac4_oFPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*o*-nitrofenil tiossemicarbazona (H2Ac4_oNO₂Ph) e as correspondentes tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4_oClPh, H2Bz4_oFPh e H2Bz4_oNO₂Ph): [Sb(2Ac4_oClPh)Cl₂], [Sb(2Ac4_oFPh)Cl₂], [Sb(2Ac4_oNO₂Ph)Cl₂], [Sb(2Bz4_oClPh)Cl₂], [Sb(2Bz4_oFPh)Cl₂] e [Sb(2Bz4_oNO₂Ph)Cl₂]. As atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* foram determinadas para as tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III).

Todos os compostos apresentaram significativa atividade antipromastigota contra *Leishmania major*, com valores de IC₅₀ inferiores ao do glucantime. A coordenação ao antimônio(III) resultou em um aumento significativo da atividade apenas no caso do ligante H₂Ac₄oFPh (IC₅₀ = 19,4 μmol·L⁻¹) e seu complexo [Sb(2Ac₄oFPh)Cl₂] (IC₅₀ = 8,5 μmol·L⁻¹). Estudos SAR não mostraram nenhuma correlação entre as propriedades físico-químicas estudadas e a atividade anti-*Leishmania* dos compostos.

Os compostos estudados foram altamente ativos contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, apresentando atividade antichagásica superior à do nifurtimox. A complexação com antimônio(III) mostrou-se interessante no caso dos complexos [Sb(2Ac₄oClPh)Cl₂] e [Sb(2Bz₄oFPh)Cl₂], os quais foram mais ativos que suas respectivas tiossemicarbazonas. No entanto, a complexação diminuiu o índice terapêutico dos compostos, indicando que a coordenação não foi uma estratégia interessante. As tiossemicarbazonas H₂Ac₄oNO₂Ph e H₂Bz₄oClPh apresentaram elevado índice terapêutico, sendo consideradas potenciais agentes antichagásicos. Estudos SAR não apresentaram nenhuma correlação entre as propriedades físico-químicas estudadas e a atividade anti-chagásica dos compostos. Por outro lado, correlações entre a citotoxicidade dos compostos e suas propriedades físico-químicas foram observadas.

Os complexos de estanho(IV) [(*n*-Bu)Sn(2Ac₄oClPh)Cl₂], [(*n*-Bu)Sn(2Ac₄oFPh)Cl₂], [(*n*-Bu)Sn(2Ac₄oNO₂Ph)Cl₂], [(*n*-Bu)Sn(2Bz₄oClPh)Cl₂], [(*n*-Bu)Sn(2Bz₄oFPh)Cl₂] e [(*n*-Bu)Sn(2Bz₄oNO₂Ph)Cl₂] foram obtidos com as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina. A atividade antifúngica das tiossemicarbazonas e seus complexos de estanho(IV) foi avaliada contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Os compostos apresentaram elevada atividade contra todas as espécies de *Candida* testadas. Em alguns casos, a atividade antifúngica foi similar ou superior à do fluconazol. De forma geral, as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina foram mais ativas que aquelas derivadas de 2-benzoilpiridina. O melhor resultado foi obtido para H₂Ac₄oNO₂Ph. Embora [(*n*-Bu)SnCl₃] tenha sido inativo, a coordenação resultou em aumento da atividade antifúngica para alguns compostos. O melhor resultado foi verificado para o complexo [(*n*-Bu)Sn(2Bz₄oNO₂Ph)Cl₂], onde a coordenação ao estanho(IV) aumentou em três vezes a atividade contra *C. albicans* e *C. krusei* e em seis vezes a atividade contra *C. glabrata* e *C. Parapsilosis*. Estudos SAR sugerem a existência de correlação inversa entre a atividade antifúngica dos compostos e suas propriedades físico-químicas contra todas as espécies de fungos testadas.

Neste trabalho, novos candidatos a fármacos foram desenvolvidos, com o intuito de ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas, doenças de origem microbiana, inflamação e doenças degenerativas como o câncer. Assim, o presente trabalho representa uma importante contribuição para a Química Inorgânica Medicinal.

Palavras-chave: hidrazonas, tiosemicarbazonas, lapachol, complexos metálicos, atividades farmacológicas

Abstract

The present work comprises the synthesis and characterization of metal compounds with bioactive ligands and the study of their pharmacological profile. Anti-inflammatory, antimicrobial, antiparasitic and antitumor drug candidates were designed.

Complex $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ was synthesized with salicylaldehyde-2-chlorobenzoyl hydrazone ($\text{H}_2\text{LASSBio-466}$), while $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ and $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$ were obtained with salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone ($\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$). The compounds were evaluated in animal models of peripheral and central nociception, and acute inflammation. All studied compounds significantly inhibited acetic acid-induced writhing response. Upon coordination, the antinociceptive activity was favored in the complex $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$. $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ inhibited only the first phase of the formalin test, while $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ was active in the second phase, indicating its ability to inhibit nociception associated with the inflammatory response. $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ inhibited both phases, but this effect was not improved upon coordination. All compounds showed levels of inhibition of zymosan-induced peritonitis comparable or higher than indomethacin, indicating an expressive anti-inflammatory profile.

Six gallium(III) complexes were obtained with 2-acetylpyridine-phenyl hydrazone (H_2AcPh), 2-acetylpyridine-*para*-chlorophenyl hydrazone ($\text{H}_2\text{AcpClPh}$), 2-acetylpyridine-*para*-nitrophenyl hydrazone ($\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph}$), and the corresponding 2-benzoylpyridine-derived hydrazones (H_2BzPh , $\text{H}_2\text{BzpClPh}$ and $\text{H}_2\text{BzpNO}_2\text{Ph}$): $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ga}(\text{2AcpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ga}(\text{2AcpNO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ga}(\text{2BzPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ga}(\text{2BzpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ga}(\text{2BzpNO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

The hydrazones and their gallium(III) complexes showed no significant activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antifungal activity of some of the compounds was similar to that of fluconazole against *Candida albicans*. Complexation significantly increased the antifungal activity, the best result being observed for $[\text{Ga}(\text{2AcpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

The studied compounds were also assayed for their cytotoxic activity against U87 (expressing wild-type p53 protein) and T98 (expressing mutant p53 protein) glioblastoma cells. All compounds showed cytotoxic activity at $1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In some cases, coordination to gallium(III) resulted in improved cytotoxic activity against the tested cells. IC_{50} values were obtained for the hydrazones, but not for their gallium(III) complexes due to their low solubility.

Hydrazones were highly cytotoxic at nanomolar doses against U87 and T98 cells. Unlike H2Bz p NO₂Ph, all hydrazones were more potent than etoposide. SAR studies suggested that stereo-electronic properties influence the cytotoxic activity of the hydrazones against the tested glioblastoma cells.

Antimalarial activity of the 2-acetylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes was evaluated. Hydrazones were highly active against *Plasmodium falciparum* and presented low toxicity against human hepatoma cells. Coordination did not improve the antimalarial activity and lead to increased cytotoxicity.

Complexes [Ga(Lp)]H₂O and [Bi(Lp)₂]Cl (Lp = lapacholate) were obtained with 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone, lapachol. Antiangiogenic activity of compounds was investigated using an animal model of inflammatory angiogenesis induced by a sponge implant. In *per os* treatment, only the bismuth(III) complex statistically reduced the amount of hemoglobin in the implants at 25 mg/kg/day of lapachol (equivalent doses of other compounds). After *ip* administration, both lapachol and its bismuth(III) complex reduced neovascularization of the implants. In this case, lapachol- and the bismuth(III) complex- treated groups did not present statistical difference between each other. Similarly, the *N*-acetylglucosaminidase (NAG) activity was reduced only by the bismuth(III) complex in the *per os* treatment, while *i.p.* treatment inhibited the angiogenic activity in the treated groups with lapachol and its bismuth(III) complex. These results suggest that the activity of complex [Bi(Lp)₂]Cl is attributed to lapachol. Thus, coordination to bismuth was a good strategy to improve the therapeutic effects of lapachol after *per os* administration.

Antimony(III) complexes were obtained with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*chlorophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4 o ClPh), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*fluorophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4 o FPh), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*nitrophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4 o NO₂Ph) and the corresponding 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones (H2Bz4 o ClPh, H2Bz4 o FPh and H2Bz4 o NO₂Ph): [Sb(2Ac4 o ClPh)Cl₂], [Sb(2Ac4 o FPh)Cl₂], [Sb(2Ac4 o NO₂Ph)Cl₂], [Sb(2Bz4 o ClPh)Cl₂], [Sb(2Bz4 o FPh)Cl₂] and [Sb(2Bz4 o NO₂Ph)Cl₂]. Anti-*Leishmania* and anti-*Trypanosoma* activities of the thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes were evaluated.

All compounds showed significant activity antipromastigote against *Leishmania major*, with IC₅₀ values lower than those glucantime. Coordination resulted in a significant increase of the activity only in the case of H2Ac4 o FPh (IC₅₀ = 19.4 μmol·L⁻¹) and its complex

[Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (IC₅₀ = 8.5 μmol·L⁻¹). SAR studies showed no correlation between the studied physico-chemical properties and anti-*Leishmania* activity of the compounds.

The studied compounds were also highly active against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*, presenting activity higher than that of the reference drug nifurtimox. Complexation of the thiosemicarbazones with antimony(III) resulted in more active compounds in the case of the complexes [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] and [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂]. However, upon coordination the therapeutic index of the compounds decreased, indicating that the coordination was not a good strategy. H2Ac4oNO₂Ph and H2Bz4oClPh showed high therapeutic index, being considered interesting anti-*Trypanosoma* drug candidates. SAR studies showed no correlation between the studied physico-chemical properties and anti-*Trypanosoma* activity of the compounds. However, correlations were found between the cytotoxicity of the compounds and their physico-chemical properties.

Complexes [(n-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂], [(n-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂], [(n-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂], [(n-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂], [(n-Bu)Sn(2Bz4oFPh)Cl₂] and [(n-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] were obtained with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones. The antifungal activity of the thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes was evaluated against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. Compounds were highly active against all tested *Candida* species. In some cases, the antifungal activity was higher or similar than that of fluconazole. In general, 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones are slightly more active than the corresponding 2-benzoylpyridine derivatives. H2Ac4oNO₂Ph exhibited the highest activity against all tested *Candida* species. [(n-Bu)SnCl₃] proved to be inactive against all species. However, in some cases coordination resulted in increased antifungal activity. The best result was found for [(n-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂], whose activity was three times higher against *C. albicans* and *C. krusei* and six times higher against *C. glabrata* and *C. parapsilosis* than that of the starting thiosemicarbazone. SAR studies showed correlations between the antifungal activity of the compounds and the studied physico-chemical properties.

In the present work, new drug candidates were developed in order to for the treatment of neglected parasitic and microbial diseases, inflammation and degenerative diseases, such as cancer. Thus, this work represents an important contribution to the Medicinal Inorganic Chemistry.

Keywords: hydrazones, thiosemicarbazones, lapachol, metal complexes, pharmacological activities

Sumário

Capítulo 1. Introdução	1
1.1 <i>Química Medicinal e Química Inorgânica Medicinal</i>	1
1.2 <i>Inflamação e Angiogênese Inflamatória</i>	3
1.3 <i>Glioblastoma</i>	5
1.4 <i>Doenças Infecciosas Causadas por Protozoários</i>	6
1.5 <i>Doenças Infecciosas Causadas por Bactérias e Fungos</i>	7
1.6 <i>Hidrazonas e a Química Medicinal</i>	9
1.7. <i>Tiossemicarbazonas e a Química Medicinal</i>	12
1.8 <i>Lapachol e a Química Medicinal</i>	15
1.9 <i>Desenvolvimento de Metalofármacos</i>	17
1.9.1 <i>Gálio: atividade farmacológica e uso na medicina</i>	18
1.9.2 <i>Zinco: atividade farmacológica e uso na medicina</i>	19
1.9.3 <i>Bismuto: atividade farmacológica e uso na medicina</i>	21
1.9.4 <i>Antimônio: atividade farmacológica e uso na medicina</i>	23
1.9.5 <i>Estanho: atividade farmacológica e uso na medicina</i>	24
1.10 <i>O Presente Trabalho</i>	25
Capítulo 2. Parte Experimental	27
2.1 <i>Materiais, Equipamentos e Procedimentos</i>	27
2.1.1 <i>Reagentes e Solventes</i>	27
2.1.2 <i>Pesagens</i>	27
2.1.3 <i>Ponto de Fusão</i>	27
2.1.4 <i>Análise Elementar</i>	27

2.1.5	<i>Análise Condutimétrica</i>	27
2.1.6	<i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	28
2.1.7	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	28
2.1.8	<i>Análise Termogravimétrica</i>	28
2.1.9	<i>Difração de Raios X</i>	28
2.2	<i>Obtenção de Ligantes e Complexos</i>	29
2.2.1	<i>Síntese de complexos de zinco(II) com as N-acil hidrazonas H₂LASSBio-466 e H₂LASSBio-1064</i>	29
2.2.2	<i>Obtenção de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina</i>	29
2.2.3	<i>Obtenção dos complexos de gálio(III) com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina</i>	30
2.2.4	<i>Obtenção do complexo de gálio(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)</i>	31
2.2.5	<i>Obtenção do complexo de bismuto(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)</i>	31
2.2.6	<i>Obtenção de N(4)-orto-clorofenil, N(4)-orto-fluorofenil e N(4)-orto-nitrofenil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina</i>	31
2.2.7	<i>Obtenção de N(4)-orto-clorofenil, N(4)-orto-fluorofenil e N(4)-orto-nitrofenil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina</i>	32
2.2.8	<i>Obtenção dos complexos de antimônio(III) de tiossemicarbazonas N(4)-orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina</i>	33
2.2.9	<i>Obtenção dos complexos de estanho(IV) de tiossemicarbazonas N(4)-orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina</i>	33
2.3	<i>Ensaio Biológicos</i>	34
2.3.1	<i>Atividade antimicrobiana</i>	34
2.3.2	<i>Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória</i>	35
2.3.2.1	<i>Animais</i>	35

2.3.2.2	<i>Teste de constrição</i>	35
2.3.2.3	<i>Avaliação de atividade nociceptiva induzida por formaldeído</i>	36
2.3.2.4	<i>Teste da placa quente</i>	37
2.3.2.5	<i>Teste de peritonite induzida por zimosano</i>	38
2.3.2.6	<i>Análise estatística</i>	38
2.3.3	<i>Atividade citotóxica contra células de glioblastoma</i>	39
2.3.3.1	<i>Linhagem de células e condições de cultura</i>	39
2.3.3.2	<i>Avaliação da atividade antitumoral</i>	39
2.3.3.3	<i>Análise morfológica de células tumorais</i>	40
2.3.4	<i>Atividade antimalárica</i>	40
2.3.4.1	<i>Cultura de Plasmodium falciparum</i>	40
2.3.4.2	<i>Avaliação de atividade antimalárica</i>	41
2.3.4.3	<i>Avaliação da citotoxicidade em células de hepatoma humano</i>	42
2.3.5	<i>Atividade antiangiogênica</i>	43
2.3.5.1	<i>Animais</i>	43
2.3.5.2	<i>Preparação dos discos de esponja e implante</i>	43
2.3.5.3	<i>Administração intraperitoneal (i.p.) e per os dos compostos</i>	44
2.3.5.4	<i>Extração do tecido e determinação das atividades de mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase</i>	44
2.3.5.5	<i>Extração de hemoglobina</i>	45
2.3.5.6	<i>Análise histológica</i>	46
2.3.5.7	<i>Análise estatística</i>	46
2.3.6	<i>Atividade antichagásica</i>	46
2.3.6.1	<i>Avaliação da atividade antichagásica</i>	46
2.3.6.2	<i>Avaliação da atividade citotóxica</i>	47
2.3.7	<i>Atividade leishmanicida</i>	47

2.3.7.1 Animais	48
2.3.7.2 Cultura de <i>Leishmania major</i>	48
2.3.7.3 Avaliação da atividade leishmanicida	48
2.3.7.4 Determinação da viabilidade celular	48
2.3.7.5 Análise estatística	49
2.4 Estudos Teóricos	49
2.4.1 Avaliação da relação estrutura-atividade – Hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina: atividade citotóxica	50
2.4.2 Avaliação da relação estrutura-atividade – Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de Sb(III) e Sn(IV): atividades anti- <i>Leishmania</i> , anti- <i>Trypanosoma</i> e antifúngica	51
Capítulo 3. Complexos de zinco(II) de hidrazonas derivadas de salicilaldeído: avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva	52
3.1 Caracterização dos complexos de zinco(II) de hidrazonas derivadas de salicilaldeído	53
3.1.1 Análises	53
3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear	55
3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho	57
3.1.4 Cristalografia de Raios X	58
3.2 Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória das hidrazonas derivadas de salicilaldeído e seus complexos de zinco(II)	63
Capítulo 4. Complexos de gálio(III) de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina: avaliação de suas atividades antimicrobiana, citotóxica e antimalárica	67
4.1 Caracterização dos complexos de gálio(III) de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	68

4.1.1 Análises	68
4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear	69
4.1.3 Espectroscopia de Infravermelho	73
4.1.4 Cristalografia de Raios X	74
4.2 Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e antimalárica das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de gálio(III)	79
4.2.1 Atividade Antimicrobiana	79
4.2.2 Atividade Citotóxica	81
4.2.3 Atividade Antimalárica	86
Capítulo 5. Complexos de gálio(III) e bismuto(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol): avaliação da atividade antiangiogênica	88
5.1 Caracterização dos complexos de gálio(III) e bismuto(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)	89
5.1.1 Análises	89
5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear	90
5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho	92
5.2 Avaliação da atividade antiangiogênica do lapachol e seus complexos de gálio(III) e bismuto(III)	93
5.2.1 Atividade Antiangiogênica	94
5.2.2 Medidas de Acumulação de Leucócitos	96
5.2.3 Análise Histológica	97
Capítulo 6. Complexos de antimônio(III) e estanho(IV) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina N(4)-orto-fenil-substituídas: avaliação das atividades antiparasitárias e antifúngicas	99

6.1. Caracterização de 2-benzoilpiridina-N(4)-orto-X-fenil tiossemicarbazonas (X = F e NO ₂)	100
6.1.1 Ressonância Magnética Nuclear	101
6.1.2 Espectroscopia de Infravermelho	104
6.1.3 Cristalografia de Raios X	104
6.2. Caracterização dos complexos de antimônio(III) de tiossemicarbazonas orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e avaliação das atividades anti-Leishmania e anti-Trypanosoma	107
6.2.1 Análises	107
6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear	109
6.2.3 Espectroscopia de Infravermelho	113
6.2.4 Cristalografia de Raios X	114
6.2.5 Atividade Anti-Leishmania	119
6.2.6 Atividade Anti-Trypanosoma	123
6.2.7 Estudos de Relação Estrutura-Atividade (SAR)	124
6.3 Caracterização de complexos de estanho(IV) de tiossemicarbazonas orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e avaliação da atividade antifúngica	126
6.3.1 Análises	126
6.3.2 Ressonância Magnética Nuclear	127
6.3.3 Espectroscopia de Infravermelho	132
6.3.4 Cristalografia de Raios X	133
6.3.5 Atividade Antimicrobiana	141
6.3.6 Estudos de Relação Estrutura-Atividade (SAR)	143
Capítulo 7. Discussão e Conclusões Gerais	145

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representação estrutural A) do salvarsan, B) da cisplatina, C) da auronofina e D) do nitroprussiato de sódio	2
Figura 1.2. Estrutura genérica de acil/aroil hidrazonas	10
Figura 1.3. Estrutura genérica de tiossemicarbazonas	12
Figura 1.4. Representação estrutural A) da hidroxiuréia, B) da triapina e C) da tiacetazona	14
Figura 1.5. Estrutura do 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, lapachol	15
Figura 1.6. Estruturas de fármacos contendo zinco. A) Acetato de zinco; B) sulfato de zinco utilizados no tratamento de doença de Wilson; C) piritionato de zinco utilizado no tratamento de seborréia; D) propionato de zinco e E) caprilato de zinco usados como antifúngicos tópicos	21
Figura 2.1. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por ácido acético em camundongos	36
Figura 2.2. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos	37
Figura 2.3. Avaliação da resposta nociceptiva no modelo da placa quente	37
Figura 2.4. Avaliação do potencial anti-inflamatório dos compostos na peritonite induzida por zimosano em camundongos	38
Figura 2.5. Avaliação da atividade antitumoral dos compostos frente a células de glioblastoma <i>in vitro</i>	40
Figura 2.6. Avaliação da atividade antimalárica dos compostos frente culturas de <i>P. falciparum in vitro</i>	42
Figura 2.7. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em células de hepatoma humano	43
Figura 2.8. Administração dos compostos na avaliação de suas atividades antiangiogênicas	44
Figura 2.9. Determinação da viabilidade celular em macrófagos	49

Figura 3.1. Estrutura das hidrazonas derivadas de salicilaldeído e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes	53
Figura 3.2. Estruturas propostas para os complexos $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (1), $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ (2) e $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$ (3)	54
Figura 3.3. Espectros de RMN de ^1H A) do complexo $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$ (3) e B) da hidrazona livre $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$	56
Figura 3.4. Diagrama ORTEP de salicilaldeído 2-clorobenzoil hidrazona ($\text{H}_2\text{LASSBio-466}$)	60
Figura 3.5. Diagrama ORTEP de $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{H}_2\text{O})]_2 \cdot [\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$ (2a)	61
Figura 4.1. Estrutura genérica dos complexos de gálio(III) das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	69
Figura 4.2. Estrutura genérica das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes	70
Figura 4.3. Representação dos isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> das hidrazonas	70
Figura 4.4. Espectros de RMN de ^1H A) do complexo $[\text{Ga}(\text{2BzpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5) e B) da hidrazona $\text{H}_2\text{BzpClPh}$ obtidos em $\text{DMSO}-d_6$	71
Figura 4.5. Diagrama ORTEP de $[\text{H}_2\text{2AcpNO}_2\text{Ph}]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	76
Figura 4.6. Empacotamento molecular de $[\text{H}_2\text{2AcpNO}_2\text{Ph}]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	76
Figura 4.7. Diagrama ORTEP do cátion $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ (1a)	77
Figura 4.8. Efeito citotóxico das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de gálio(III) contra as células de glioblastoma U87 e T98. As células foram tratadas com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por um período de 48 horas e a sobrevivência celular foi medida pelo método MTT	82
Figura 4.9. Células de glioblastoma U87 e T98 e células de fibroblastos humano MRC5 tratadas com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina. Amplificação: 400 X	84
Figura 4.10. Células de glioblastoma U87 e células de fibroblastos humano MRC5 tratadas com $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ e coradas com DAPI. Amplificação: 400 X	85

Figura 5.1. Estruturas propostas para A) o complexo de gálio(III) $[Ga(Lp)_3] \cdot H_2O$ e B) o complexo de bismuto(III) $[Bi(Lp)_2]Cl$	90
Figura 5.2. Estrutura do lapachol e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes	91
Figura 5.3. Espectros de RMN de 1H A) do lapachol e B) do complexo $[Bi(Lp)_2] \cdot Cl$ (2) obtidos em $DMSO-d_6$	92
Figura 5.4. Efeitos na vascularização dos implantes induzidos pelo lapachol, seus complexos de gálio(III) (1) e bismuto(III) (2) e os sais $Ga(NO_3)_3$ e $BiCl_3$ no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja ($n = 6-8$) para tratamento <i>per os</i> , utilizando-se uma dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol. Estatisticamente diferente em comparação com o grupo controle: $*P < 0,05$	94
Figura 5.5. Efeitos na vascularização dos implantes induzidos pelo lapachol, seu complexo de bismuto(III) e o sal $BiCl_3$ no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja ($n = 6-8$) para tratamento <i>per os</i> , utilizando-se uma dose de lapachol igual a 2,5 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol	95
Figura 5.6. Efeitos na vascularização dos implantes induzidos pelo lapachol, seu complexo de bismuto(III) (2) e o sal $BiCl_3$ no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja ($n = 6-8$) para tratamento i.p. utilizando-se uma dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol. Estatisticamente diferente em comparação com o grupo controle. $*P < 0,05$	96
Figura 5.7. Efeitos na acumulação de macrófagos induzidos pelo lapachol, seu complexo de bismuto(III) e o sal $BiCl_3$ no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja ($n = 8-13$). A) Tratamento <i>per os</i> com dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia; B) Tratamento <i>per os</i> com dose de lapachol igual a 2,5 mg/Kg/dia; C) Tratamento i.p. com dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol. Estatisticamente diferente em comparação com o grupo controle. $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$	97

Figura 5.8. Corte histológico representativo de tecido fibrovascular induzido em implante de esponja em camundongos suíços após 9 dias de implantação. Formação de tecidos A) no implante do grupo controle; B) no implante do grupo tratado com lapachol C) no implante do grupo tratado com complexo de bismuto(III). A barra correspondente a 100 μm	98
Figura 6.1. Estrutura genérica dos isômeros configuracionais <i>Z</i> e <i>E</i> das tiossemicarbazonas <i>N</i> (4)- <i>o</i> -substituídas e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes	101
Figura 6.2. Espectro de RMN de ^1H da tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oNO}_2\text{Ph}$ obtido em $\text{DMSO-}d_6$	102
Figura 6.3. Espectro de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oF}_2\text{Ph}$ obtido em $\text{DMSO-}d_6$	103
Figura 6.4. Diagrama ORTEP de $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oNO}_2\text{Ph}$, apresentando as ligações de hidrogênio intramoleculares existentes	106
Figura 6.5. Estrutura genérica dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	108
Figura 6.6. Numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes das tiossemicarbazonas <i>N</i> (4)- <i>orto</i> - <i>X</i> substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina ($X = \text{Cl}, \text{F}$ e NO_2)	109
Figura 6.7. Espectros de RMN de ^1H A) do ligante $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ e B) do seu respectivo complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (1), obtido em $\text{DMSO-}d_6$	110
Figura 6.8. Espectros de RMN de ^{13}C A) do ligante $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ e B) do seu respectivo complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (1), obtido em $\text{DMSO-}d_6$	111
Figura 6.9. Diagramas ORTEP dos complexos $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (1) e $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (2)	114
Figura 6.10. Empacotamento molecular do complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (1)	118

Figura 6.11. Avaliação da citotoxicidade das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III) nas concentrações de 10, 30 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no ensaio de viabilidade celular por medida de atividade de LDH. Testes realizados em triplicata. ##P < 0,01 em relação ao controle negativo (células cultivadas apenas com meio); *P < 0,05 e **P < 0,01 em relação ao grupo de células cultivadas com meio e veículo	122
Figura 6.12. Estrutura genérica dos complexos de Sn(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	127
Figura 6.13. Espectros de RMN de ^1H A) do ligante H2Bz4oFPh e B) do seu respectivo complexo $[\text{Sn}(\text{2Bz4oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (11), obtido em DMSO- d_6	129
Figura 6.14. Espectros de RMN de ^{13}C A) do ligante H2Ac4oClPh e B) do seu respectivo complexo $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), obtido em DMSO- d_6	130
Figura 6.15. Diagramas ORTEP dos complexos $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]\cdot\text{DMSO}$ (8a), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Sn}(\text{2Bz4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12)	134
Figura 6.16. Empacotamento molecular do complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (7)	138

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Atribuição do tipo de eletrólito ¹ para soluções de concentração 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	28
Tabela 3.1. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar** e massa molar dos complexos [Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1), [Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2) e [Zn(LASSBio-1064)] ₂ (3)	55
Tabela 3.2. Atribuição, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹ H das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e dos seus respectivos complexos de zinco(II)	57
Tabela 3.3. Atribuição e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e dos seus respectivos complexos de zinco(II)	57
Tabela 3.4. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e dos seus respectivos complexos de zinco(II)	58
Tabela 3.5. Resumo da coleção de dados e de refinamento da hidrazona H ₂ LASSBio-466 e do complexo [Zn(LASSBio-1064)(H ₂ O)] ₂ ·[Zn(LASSBio-1064)(DMSO) ₂] ₂ (2a)	56
Tabela 3.6. Comprimento de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados de salicilaldeído 2-clorobenzoil hidrazona (H ₂ LASSBio-466)	61
Tabela 3.7. Comprimento de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados do complexo [Zn(LASSBio-1064)(H ₂ O)] ₂ ·[Zn(LASSBio-1064)(DMSO) ₂] ₂ (2a)	63
Tabela 3.8. Efeito das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) na constrição abdominal induzida por ácido acético em camundongos	64
Tabela 3.9. Efeito das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) na nocicepção induzida por formaldeído em camundongos	65
Tabela 3.10. Efeito das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) no teste da placa quente em camundongos	66
Tabela 3.11. Efeito das hidrazonas H ₂ LASSBio-466 e H ₂ LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) na peritonite induzida zimosano em camundongos	66

Tabela 4.1. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, termogravimetria**, massa molar e condutividade molar das hidrazonas derivadas de 2-acetilpirina e seus complexos de gálio(III)	69
Tabela 4.2. Atribuições, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹ H obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III)	72
Tabela 4.3. Atribuições, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹ H das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e dos seus complexos de gálio(III). Espectros obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ * ou CDCl ₃ **	72
Tabela 4.4. Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III)	72
Tabela 4.5. Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e dos seus complexos de gálio(III). Espectros obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ * ou CDCl ₃ **	73
Tabela 4.6. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) dos complexos [Ga(2AcPh) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (1), [Ga(2AcpClPh) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (2), [Ga(2AcpNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·1,5H ₂ O (3), [Ga(2BzPh) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (4), [Ga(2BzPhClPh) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (5) e [Ga(2BzPhNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (6)	73
Tabela 4.7. Resumo da coleção de dados e de refinamento da hidrazona [H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O e do complexo [Ga(2AcPh) ₂] ⁺ (1a)	75
Tabela 4.8. Ângulos de ligação (°) selecionados das hidrazonas [H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O e H ₂ AcPh ¹¹ e do complexo [Ga(2AcPh) ₂] ⁺ . Desvios padrão entre parênteses	78
Tabela 4.9. Comprimentos de ligação (Å) selecionados das hidrazonas [H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O e H ₂ AcPh ¹¹ e do complexo [Ga(2AcPh) ₂] ⁺ . Desvios padrão entre parênteses	79
Tabela 4.10. Distâncias de ligações de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para a hidrazona [H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O. Desvios padrão entre parênteses	79

Tabela 4.11. Concentração inibitória mínima (CIM) das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina, seus complexos de gálio(III), cloridrato de tetraciclina e fluconazol contra <i>S. aureus</i> (ATCC6538) e <i>C. albicans</i> (ATCC18804)	80
Tabela 4.12. de IC ₅₀ (nmol L ⁻¹) para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e etoposídeo frente a células de glioblastoma U87 e T98 e frente a células de fibroblastos humano MRC5	83
Tabela 4.13. Propriedades estéreo-eletrônicas calculadas para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	86
Tabela 4.14. Valores experimentais de IC ₅₀ frente <i>Plasmodium falciparum</i> e de LD ₅₀ frente a células de hepatoma humano para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina	87
Tabela 5.1. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, massa molar e condutividade molar dos complexos de gálio(III) e bismuto(III) de lapachol	89
Tabela 5.2. Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ¹ H do lapachol e dos seus complexos de gálio(III) (em CDCl ₃) e bismuto(III) (em DMSO- <i>d</i> ₆)	91
Tabela 5.3. Atribuição das principais bandas de infravermelho do lapachol e seus complexos de gálio(III) e bismuto(III), obtidos em pastilhas de KBr (dadas em cm ⁻¹)	93
Tabela 6.1 Cores, temperaturas de fusão, massa molar (MM) e rendimentos de reação para H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO ₂ Ph	101
Tabela 6.2. Atribuições, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹ H das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO ₂ Ph	102
Tabela 6.3. Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO ₂ Ph	103
Tabela 6.4. Atribuição das principais bandas de infravermelho das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO ₂ Ph, dadas em cm ⁻¹	104
Tabela 6.5. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento da tiossemicarbazona H2Bz4oNO ₂ Ph	105
Tabela 6.6. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados das tiossemicarbazonas H2Bz4Ph ²⁴ e H2Bz4oNO ₂ Ph. Desvios padrão entre parênteses	107

Tabela 6.7. Distâncias de ligações de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para a tiossemicarbazona H2Bz4oNO ₂ Ph. Desvios padrão entre parênteses	107
Tabela 6.8. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	108
Tabela 6.9. Atribuições (A), número de hidrogênio (N°) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	111
Tabela 6.10. Atribuições (A), número de hidrogênio (N°) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	112
Tabela 6.11. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	112
Tabela 6.12. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	112
Tabela 6.13. Atribuição das principais bandas de infravermelho dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes, dadas em cm ⁻¹	113
Tabela 6.14. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	115
Tabela 6.15. Comprimentos de ligação (Å) selecionados da hidrazona H2Ac4oClPh ¹⁷ e dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2). Desvios padrão entre parênteses	117
Tabela 6.16. Ângulos de ligação (°) selecionados da hidrazona H2Ac4oClPh ¹⁷ e dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2). Desvios padrão entre parênteses	117

Tabela 6.17. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	118
Tabela 6.18. Atividade e eficácia leishmanicida <i>in vitro</i> para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III) frente as formas promastigotas de <i>Leishmania major</i>	119
Tabela 6.19. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>in vitro</i> para tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III) frente a forma epimastigota (cepa Tulahuen 2)	123
Tabela 6.20. Propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III)	125
Tabela 6.21. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, massa molar e condutividade molar (em cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹) dos complexos de Sn(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina	127
Tabela 6.22. Atribuições (A), número de hidrogênio (N°) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹ H dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	129
Tabela 6.23. Atribuições (A), número de hidrogênio (N°) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H dos complexos de estanho(III) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	130
Tabela 6.24. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	131
Tabela 6.25. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆)	131
Tabela 6.26. Deslocamento químico (ppm) do sinal de RMN de ¹¹⁹ Sn e acoplamentos ⁿ J(¹³ C- ¹¹⁹ Sn) dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- <i>d</i> ₆) ...	132

Tabela 6.27. Atribuição das principais bandas de infravermelho dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas <i>orto</i> -substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina, dadas em cm^{-1}	133
Tabela 6.28. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento dos complexos $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]\cdot\text{DMSO}$ (8a) e $[\text{Sn}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9)	135
Tabela 6.29. Tabela 6.29. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento dos complexos $[\text{Sn}(\text{2Bz4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12)	136
Tabela 6.30. Comprimentos de ligação (Å) selecionados das tiossemicarbazonas H2Ac4oClPh^{17} e $\text{H2Bz4oNO}_2\text{Ph}$ (seção 6.1.3) e dos complexos $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]\cdot\text{DMSO}$ (8a), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Sn}(\text{2Bz4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12). Desvios padrão entre parênteses	139
Tabela 6.31. Ângulos de ligação ($^\circ$) selecionados das tiossemicarbazonas H2Ac4oClPh^{17} e $\text{H2Bz4oNO}_2\text{Ph}$ (seção 6.1.3) e dos complexos $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]\cdot\text{DMSO}$ (8a), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Sn}(\text{2Bz4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12). Desvios padrão entre parênteses	140
Tabela 6.32. Distâncias (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligação de hidrogênio dos complexos $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]\cdot\text{DMSO}$ (8a), $[\text{Sn}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Sn}(\text{2Bz4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12)	141
Tabela 6.33. Concentração inibitória mínima (CIM, μM) das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de estanho(IV) frente <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i>	142
Tabela 6.34. Propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de estanho(IV)	144

Lista de Abreviaturas

Administração i.p. – Administração intraperitoneal
Administração *per os* – Administração oral
BSG – Subgalato de bismuto
BSN – Subnitrito de bismuto
BSS – Subsalicilato de bismuto
CBS – Subcitrato de bismuto coloidal
CIM – Concentração inibitória mínima
CMC – Carboximetilcelulose
DAPI – 4'-6-diamidina-2-fenilindol
DFT – Teoria do funcional da densidade (Density Functional Theory)
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultura)
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
Hb – Hemoglobina
HRP2 – Proteína rica em histidina II
H&E – Hematoxilina e eosina
IT – Índice terapêutico
LASSBio – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LDH – Enzima lactato desidrogenase
MMFF – Merck Molecular Force Field
MPO – Enzima mieloperoxidase
MTT – Brometo de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio
NAG – Enzima *N*-acetilglicosamidase
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PIH – Piridoxal isonicotinoil hidrazona
RBC – Citrato de bismuto/ranitidina
RDR – Enzima ribonucleosídeo difosfato redutase
RMN – Ressonância magnética nuclear
RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SAR – Relação estrutura atividade

SEM – Erro padrão da medida

SPECT – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

TG – Termogravimetria

TMB – Tetrametilbenzidina

TMZ – Temozolomida (Temodal[®])

Capítulo 1. Introdução

1.1 Química Medicinal e Química Inorgânica Medicinal

A manutenção da vida de um organismo exige a presença de vários elementos químicos em quantidades específicas. Por um lado, o excesso de um determinado elemento pode ser tóxico, enquanto que por outro, a ausência ou diminuição de algum elemento pode causar uma redução na função realizada por ele ou, até mesmo, a morte do organismo.¹

A Química Medicinal, segundo definição da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), é uma área da química que engloba aspectos das ciências biológica, médica e farmacêutica, visando o planejamento, a invenção, a descoberta, a identificação e a preparação de compostos biologicamente ativos, bem como o estudo do metabolismo, a interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica desses compostos.²

A predominância de hidrogênio, oxigênio, carbono e nitrogênio nos seres vivos induziu por muito tempo a crença de que apenas os compostos orgânicos e as reações que os envolviam eram indispensáveis para a vida. Neste contexto, os elementos e compostos comumente denominados “inorgânicos” eram considerados como de pouca ou nenhuma importância para os sistemas biológicos.³ No entanto, atualmente está claro que muitos elementos inorgânicos, embora geralmente presentes em quantidades muito pequenas, apresentam papéis importantes nos sistemas vivos.⁴ Diversos metais são encontrados em proteínas, enzimas e cofatores, os quais são requeridos em vários processos biológicos. Um exemplo é a hemoglobina, a qual possui um complexo porfirínico de ferro utilizado no transporte de O₂.⁵ Por sua vez, o cobalto é encontrado na coenzima B12, a qual é essencial para a transferência de grupos alquil de uma molécula a outra em sistemas biológicos.⁶ Outros metais como cobre, zinco e manganês também são incorporados em proteínas catalíticas (metaloenzimas), as quais participam de reações químicas necessárias à vida.⁷

Além da importância biológica dos metais nos seres vivos, estudos relatam que o uso de metais na Medicina vem sendo praticado há muito tempo. Os egípcios utilizaram o cobre para

¹ R.F. De Farias (2005) Química de Coordenação: Fundamentos e Atualidades. São Paulo: Editora Átomo.

² <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#m1> (Acessado em 07 de outubro de 2011).

³ E.J. Baran, Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 7.

⁴ M. Satake, Y. Mido (2006) Bioinorganic Chemistry. New Delhi: Discovery Publishing House.

⁵ S.V. Lepeshkevich, S.A. Biziuk, A.M. Lemeza, B.M. Dzhagarov, BBA – Proteins Proteom. 1814 (2011) 1279.

⁶ M. Uyemura, T. Ainda, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 11392.

⁷ R.M. Roat-Malone (2002) Bioinorganic Chemistry: A short course. Washington: Wiley-Interscience.

esterilizar a água há 3000 anos a.C.. Ainda no Egito, cerca de 3500 anos atrás, o ferro era utilizado em formulações medicamentosas, enquanto que, na mesma época, o ouro era empregado na fabricação de medicamentos por árabes e chineses, os quais acreditavam que metais nobres traziam benefícios à saúde. Mais recentemente, no século XVI, o médico suíço Theophrastus Paracelsus desenvolveu e utilizou medicamentos à base de mercúrio.^{8,9}

Embora diferentes metais tenham sido utilizados por cerca de 5000 anos, o uso clínico de compostos inorgânicos iniciou-se apenas em princípios do século XX com a utilização do $K[Au(CN)_2]$ para o tratamento de tuberculose, bem como de compostos de antimônio para *leishmanioses*. Ainda na primeira década do século do XX, Paul Ehrlich desenvolveu o composto arsenical, denominado Salvarsan (Figura 1.1-A), para o tratamento de sífilis.⁸ Mesmo assim, a Química Medicinal dedicou-se durante muitos anos ao estudo, principalmente, de compostos orgânicos e produtos naturais.

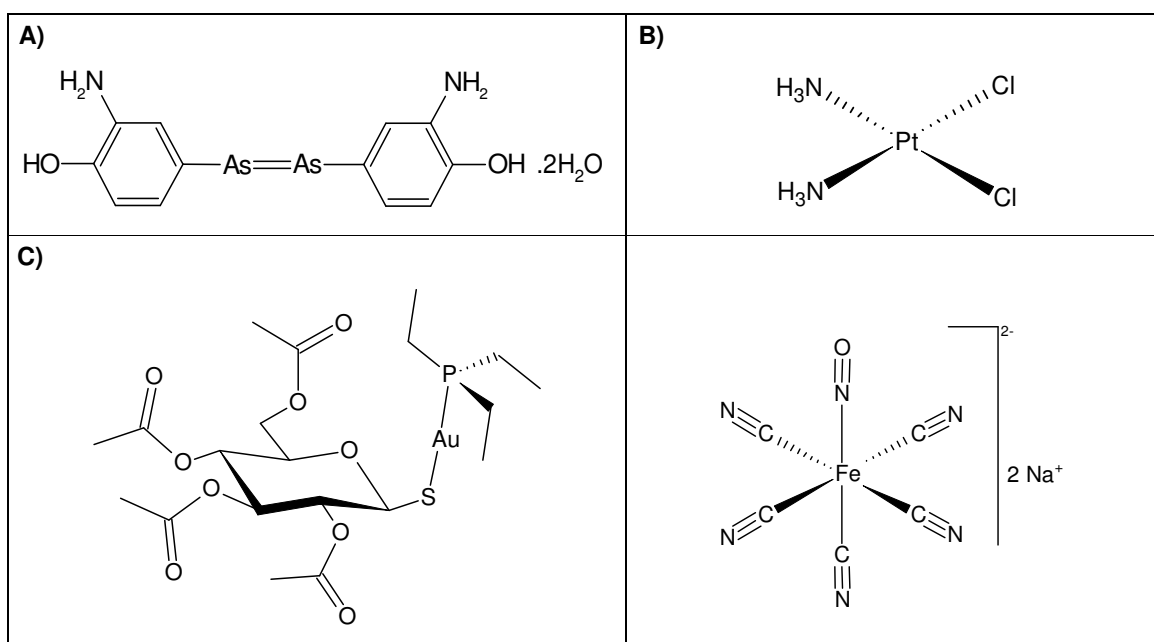


Figura 1.1. Representação estrutural A) do salvarsan, B) da cisplatina, C) da auronofina e D) do nitroprussiato de sódio.

O grande progresso na Química Inorgânica Medicinal ocorreu a partir de 1965, quando Barnett Rosenberg descobriu as propriedades antitumorais do $cis[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, conhecido como

⁸ C. Orvig, M. J. Abrams, Chem. Rev. 99 (1999) 2201.

⁹ H. Beraldo, Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 4.

cisplatina (Figura 1.1-B).^{10,11} Esta descoberta impulsionou a busca por novos compostos metálicos com diferentes propriedades farmacológicas e, desde então, a Química Inorgânica tem feito grandes contribuições para as ciências médicas.^{12,13,14,15}

Dentre os diversos compostos inorgânicos que entraram em uso clínico nos últimos anos, pode-se citar: a auranofina, contendo Au(I), utilizada no tratamento de artrite reumatóide¹⁶ (Figura 1.1-C), o antimoniato de meglumina usado contra *leishmanioses*¹⁷, o nitroprussiato de sódio, empregado em emergências hipertensivas¹⁸ (Figura 1.1-D), diversos agentes de imagem SPECT contendo ^{99m}Tc¹⁹, dentre outros. Além disso, o interesse no uso e aplicação de compostos inorgânicos na medicina continua a expandir. Conferências Internacionais, tais como International Conference on Bioinorganic Chemistry (ICBIC) e a European Conference on Bioinorganic Chemistry (EUROBIC) possuem agora uma fração significativa de apresentações dedicadas a “Metais em Medicina”. A participação de pesquisadores e representantes de indústrias farmacêuticas na conferência intitulada “Metal ions in Medicine: targets, diagnostic and therapeutics”, realizada em junho de 2002 no campus do National Institute of Health, nos Estados Unidos, também ressalta o interesse despertado recentemente pela Química Inorgânica Medicinal.²⁰ Desta forma, a Química Inorgânica Medicinal é uma área nova da Química em crescente expansão, a qual apresenta um grande potencial para desenvolver novos agentes terapêuticos e de diagnósticos.

No presente trabalho, procurou-se desenvolver novos agentes anti-inflamatórios, antitumorais, antiparasitários e antimicrobianos através da Química Inorgânica Medicinal.

1.2 Inflamação e Angiogênese Inflamatória

A inflamação é um processo complexo, que envolve vários tipos celulares e seus mediadores, leitos capilares e fibras sensoriais, além de proteínas presentes no sangue. O

¹⁰ P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 197.

¹¹ S.M. Cohen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (2007) 115.

¹² C.X. Zhang, S.J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481.

¹³ S. Ahmad, A.A. Isab, S. Ali, A.R. Al-Arfaj, *Polyhedron* 25 (2006) 1633.

¹⁴ T.W. Hambley, *Dalton Trans.* (2007) 4929.

¹⁵ L.E. Scott, C. Orvig, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4885.

¹⁶ C.F. Shaw III, *Chem Rev.* 99 (1999) 2589.

¹⁷ E.R.T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 42 (2002) 217.

¹⁸ W.P. Arnold, D.E. Longnecker, R.M. Epstein, *Anesthesiology* 61 (1984) 254.

¹⁹ M.L. Bowen, C. Orvig, *Chem. Commun.* 41 (2008) 5077.

²⁰ N. Farrell, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 1.

processo tem como objetivo isolar e destruir um antígeno e estimular a reconstituição do tecido danificado.²¹

No século I d.C., Celsus descreveu os principais sintomas da inflamação como sendo rubor (eritema), tumor (edema), calor e dor. Visto que os principais mecanismos de defesa contra antígenos estão no sangue (anticorpos e leucócitos), uma das primeiras alterações é o aumento do fluxo sanguíneo na região lesada, ocasionando o eritema. Em seguida, ocorre o extravasamento de plasma e desenvolvimento de edema.²² Por sua vez, a dor representa o sintoma associado a doenças que mais causa desconforto aos pacientes. Ela é definida como uma experiência sensorial, emocional e cognitiva desagradável associada a uma lesão real ou potencial. Ao contrário de outras sensações, codificadas por receptores em terminações nervosas diferenciadas, a percepção de um estímulo nocivo é feita por terminações livres de neurônios, os nociceptores. Assim, a nocicepção é o componente fisiológico da dor, compreendendo a transmissão e o processamento da informação dolorosa. Baseado nesses conceitos, o termo dor, por envolver um componente emocional, é melhor aplicado a seres humanos, enquanto o termo nocicepção é indicado para animais.^{22,23}

A inflamação aguda possui um papel fisiológico em circunstâncias normais, representando fundamentalmente uma resposta protetora. Por outro lado, a resposta inflamatória crônica exerce efeitos prejudiciais na função de células e tecidos, ocasionando sequelas indesejáveis. Nesses casos, utilizam-se fármacos que reduzem o processo inflamatório, impedindo a produção, liberação ou ação de mediadores inflamatórios, ou ainda que induzam a produção de fatores endógenos com propriedades anti-inflamatórias.²⁴

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes, o qual é fundamental para a embriogênese, para o reparo de tecidos após algum dano, e outros casos.²⁵ No entanto, angiogênese também contribui para uma variedade de condições patológicas. De fato, angiogênese e inflamação atuam concomitante e sinergisticamente para a manutenção de vários processos inflamatórios crônicos, tais como artrite reumatóide, doença de Crohn e psoríase. Estudos demonstram que células inflamatórias, tais como macrófagos e neutrófilos, contribuem para o processo de angiogênese.²⁶ Desta forma,

²¹ K.J. Tracey, *Nature* 420 (2002) 853.

²² R.S. Cotran, V. Kumar, T. Collins, *Robbins pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, 1999.

²³ D. Julius, A. I. Basbaum, *Nature*, 413 (2001) 203.

²⁴ J. R. Vane, *Nat New Biol.*, 231(1971) 232.

²⁵ D.A. Walsh, C.I. Pearson, *Arthritis Res.* 3 (2001) 147.

²⁶ Y. Gong, D.-R. Koh, *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 437.

terapias que atenuem angiogênese inflamatória e processos fibróticos são hábeis para prevenir e/ou amenizar condições inflamatórias crônicas.

1.3 Glioblastoma

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.²⁷ Atualmente, o câncer é a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento.²⁸ Embora os tumores cerebrais representem apenas 1-2 % dos tumores em adultos, eles possuem um prognóstico ruim e a chance de sobrevivência dos pacientes é geralmente muito baixa. Além disso, tumores cerebrais representam um dos tumores sólidos mais comuns em crianças, sendo responsáveis por 20 % das neoplasias infantis.^{29,30}

Gliomas, especialmente glioblastomas, representam os tumores cerebrais primários mais malignos. Os glioblastomas possuem uma alta taxa de proliferação celular e uma acentuada propensão para se infiltrar difusamente em regiões sadias do cérebro, tornando impossível a extirpação cirúrgica total e dificultando a radioterapia local efetiva. O crescimento agressivo e invasivo é a principal característica desse tipo de tumor, sendo responsável pela sua alta morbidade e mortalidade.³¹

O papel da quimioterapia no tratamento de glioblastoma tem sofrido consideráveis mudanças nas últimas duas décadas, devido à introdução do temodal[®] (temozolomida, TMZ). A utilização de TMZ em adição à radioterapia e ao processo cirúrgico, aumenta o tempo de vida sem progressão do tumor. Além disso, a baixa toxicidade do TMZ tem possibilitado a utilização deste fármaco por longos períodos. No entanto, apesar dos avanços, o prognóstico dos pacientes com glioblastoma permanece ruim, com sobrevivência média de 15 meses.³² Assim, a busca por novos fármacos para o tratamento de glioblastomas permanece um desafio para os químicos medicinais.

²⁷ <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>, Instituto Nacional do Câncer. Acessado em 05/12/2011.

²⁸ A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69.

²⁹ M.A. Soares, P.B. Pujatti, C.L. Fortes-Dias, L. Antonelli, R.G. Santos, J. *Venom. Anim.Toxins. Incl. Trop. Dis.* 16 (2010) 480.

³⁰ C.A. Perez, L.W. Brady, *Principles and practice of radiation oncology*, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1997.

³¹ E. Nuti, F. Casalini, S. Santamaria, P. Gabelloni, S. Bendinelli, E. Da Pozzo, B. Costa, L. Marinelli, V. La Pietra, E. Novellino, M.M. Bernardo, R. Fridman, F. Da Settimo, C. Martini, A. Rossello, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2617.

³² D. Beier, J.B. Schulz, C.P. Beier, *Mol. Cancer* 10 (2011) 128.

1.4 Doenças Infecciosas causadas por Protozoários

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas e parasitárias são as maiores causas de doenças humanas no mundo. Ao contrário de outras doenças que recebem alto nível de atenção do sistema de saúde, um grupo de doenças parasitárias e infecciosas tem sido caracterizado pelo baixo investimento recebido pelas indústrias farmacêuticas ao longo do tempo. Atualmente, mais de um bilhão de pessoas são afetadas por doenças negligenciadas.³³

Malária, doença de Chagas e leishmanioses estão entre as principais doenças infecciosas causadas por protozoários no mundo, sendo que as três são consideradas doenças negligenciadas.

A malária é considerada a mais importante doença infecciosa do mundo em termos de sofrimento humano e número de óbitos decorrentes da doença.³⁴ Segundo dados da OMS, aproximadamente 1 milhão de pessoas morrem por ano em decorrência de malária.³⁵ Hoje, ela é endêmica em mais de 100 países, afetando especialmente áreas tropicais da África, Ásia e América Latina, sendo responsável pela alta mortalidade e morbidade nestas regiões. Além disso, o número de casos em áreas não-endêmicas vem aumentando, devido à imigração e viagens para regiões endêmicas.^{34,36}

A malária humana é causada por quatro espécies diferentes de *Plasmodium*, sendo a forma mais severa causada pelo *Plasmodium falciparum*. Este protozoário é responsável pela morte de cerca de 1 % dos pacientes infectados. Tentativas de erradicar a malária na maior parte do mundo foram realizadas em larga escala na década de 50, mas não resultaram em êxito, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados.³⁴ Desta forma, observa-se uma crescente necessidade de desenvolver fármacos eficientes que apresentem novos mecanismos de ação.

A doença de Chagas é a terceira principal doença a atingir a América Latina, representando um grande problema de saúde pública. O agente etiológico da doença de Chagas é

³³ World Health Organization, 2009. 10 Facts on neglected tropical diseases web page. Available: http://www.who.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/en/index.html (accessed July 2010).

³⁴ A.G. Gilman, L.S. Goodman, As bases farmacológicas da terapêutica, 11ª Ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 2006.

³⁵ <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>, World Health Organization: WHO Malaria, 2009. Acessado em 12/09/2010.

³⁶ R.B. de Oliveira, E.M. de Souza-Fagundes, R.P.P. Soares, A.A. Andrade, A.U. Krettli, C.L. Zani, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 1983.

o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, estima-se que 15 milhões de pessoas estejam infectadas e outras 25 milhões habitem em regiões de risco.³⁷

O tratamento da doença de Chagas é baseado principalmente em dois fármacos, o nifurtimox e o benznidazol, ambos introduzidos na clínica há mais de três décadas. Embora esses medicamentos sejam capazes de curar a parasitemia e curar ou melhorar o estágio agudo da infecção, eles apresentam pouca ação na fase crônica da doença.³⁴ Além disso, severos efeitos colaterais e aparecimento de resistência aos fármacos são observados.³⁸ Essas desvantagens intensificam a busca por fármacos mais efetivos e menos tóxicos ao ser humano.

As leishmanioses, por sua vez, são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e encontram-se entre as cinco principais doenças parasitárias mundiais, estando presente em 98 países dos cinco continentes.^{34,39} Segundo a OMS, essa doença afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas, com incidência anual de 1,5 a 2 milhões de novos casos.

A quimioterapia da leishmaniose consiste principalmente dos antimoniais glucantime[®] e pentostan[®], os quais representam os fármacos de primeira escolha na maioria dos países, incluindo o Brasil. Além disso, os fármacos de segunda escolha pentamidina, e diversas formulações contendo anfotericina B são utilizados em pacientes hipersensíveis ao antimônio ou que apresentam resistência aos antimoniais. No entanto, o tratamento, tanto com fármacos de primeira escolha quanto com fármacos de segunda escolha, é insatisfatório devido aos elevados níveis de toxicidade que esses medicamentos apresentam.³⁴ Em virtude dos sérios efeitos colaterais decorrentes da toxicidade desses compostos, da crescente frequência de resistência ao tratamento e das contra-indicações apresentadas pelos fármacos, a busca por novas opções terapêuticas para o tratamento de leishmanioses torna-se evidente.

1.5 Doenças Infecciosas causadas por Bactérias e Fungos

O sistema de saúde é desafiado constantemente por complicações infecciosas relacionadas à assistência, as quais constituem um grave problema de saúde pública mundial. Essas infecções, denominadas infecções hospitalares, são responsáveis por aumentar a morbidade e a mortalidade entre os pacientes e elevar os custos hospitalares.⁴⁰

A classificação básica dos medicamentos utilizados em infecções microbianas os divide em dois grupos: antibióticos e antimicrobianos. Os antibióticos, como a penicilina, são

³⁷ W. Porcal, P. Hernández, L. Boiani, M. Boiani, A. Ferreira, A. Chidichimo, J.J. Cazzulo, C. Olea-Azar, M. González, H. Cerecetto, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 6995.

³⁸ M.M. De Mecca, E.G. Diaz, J.A. Castro, *Toxicol. Lett.* 136 (2002) 1.

³⁹ K. Ait-Oudhia, E. Gazanion, B. Vergnes, B. Oury, D. Sereno, *Parasitol. Res.* 109 (2011) 1225.

⁴⁰ M.S. Pereira, *Ver. Esc. Enferm. USP* 27 (1993) 355.

substâncias produzidas por organismos vivos, como fungos, e suprimem o crescimento ou até mesmo destroem outros organismos, como bactérias. Os antimicrobianos, por sua vez, são compostos derivados de síntese ou semi-síntese e são as substâncias que mais enriqueceram nosso arsenal terapêutico atual.⁴¹

Embora um grande número de antimicrobianos já tenha sido desenvolvido, nos últimos 30 anos observou-se um aumento notável da resistência dos microorganismos, principalmente em áreas de atenção a pacientes graves. Essa resistência aos fármacos existentes deve-se ao uso indiscriminado de medicamentos fortes e à propagação de microorganismos pessoa-a-pessoa.⁴² Nos Estados Unidos, por exemplo, entre os anos de 1998 e 2003, verificou-se um aumento de cerca de 12 % na resistência de amostras da bactéria *Staphylococcus aureus* à oxacilina, bem como um aumento de até 47 % na resistência da bactéria *Klebsiella pneumoniae* às cefalosporinas de terceira geração.

Pseudomonas aeruginosa é um exemplo que se destaca nesse cenário. Essa bactéria é frequentemente isolada a partir de espécies clínicas de pacientes com infecção hospitalar, apresentando resistência simultânea a um grande número de antimicrobianos disponíveis. Cerca de 30 % dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* são resistentes a três ou mais fármacos e situação similar é observada para outros microorganismos.⁴²

Além das bactérias, várias espécies de fungos também são patogênicas e causam graves danos a plantas e animais.⁴³ Exemplos de fungos patogênicos são as diferentes espécies de *Candida*. *Candida albicans* são fungos que podem viver como microorganismos comensais em indivíduos saudáveis, mas são capazes de causar infecções em indivíduos com comprometimento imunológico. Eles são responsáveis pela quarta maior causa de infecções hospitalares e estão associados com taxa de mortalidade próxima de 50 %. Outras espécies de fungos têm aumentado sua incidência nas últimas décadas, sendo considerados fungos patogênicos emergentes.^{44,45}

Desta forma, a crescente incidência de infecções hospitalares e o aumento de resistência dos microorganismos patogênicos aos fármacos disponíveis demonstram a necessidade de desenvolver novos fármacos com mecanismos de ação diferentes dos existentes.

⁴¹ D. L. Hawksworth, A. Y. Rossman, *Phytopathol.* 87 (1997) 888

⁴² Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P.K. Singh, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 877.

⁴³ J. Marui, A. Yoshimi, D. Hagiwara, Y. Fujii-Watanabe, K. Oda, H. Koike, K. Tamano, T. Ishii, M. Sano, M. Machida, K. Abe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 1829.

⁴⁴ M.A. Pfaller, D.J. Diekema, *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (2007) 133.

⁴⁵ A.S. Ribeiro, D.A. Silva, F.P. Silva, G.C. Santos, L.M.S. Soares, L.V.N. Oliveira, D.A. Santos, *Braz. J. Microbiol.* 41 (2010) 19.

1.6 Hidrazonas e a Química Medicinal

As hidrazonas são bases de Schiff pertencentes a uma classe de compostos caracterizada por conter o esqueleto $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ e que apresentam uma variedade de aplicações químicas e farmacológicas. A obtenção destes compostos geralmente ocorre pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos, sendo comumente necessária a utilização de catálise ácida.⁴⁶

Devido ao comportamento quelante dessas moléculas, as hidrazonas são usadas como reagentes analíticos para determinar quantidades traço de íons metálicos.⁴⁷ Além disso, esses compostos são usados no controle de pragas agrícolas⁴⁸, enquanto hidrazonas aromáticas são utilizadas em fotorreceptores eletrofotográficos de impressores a *laser*⁴⁹.

Um grande número de bioatividades também tem sido relatado para derivados de hidrazonas, tais como atividades antimicrobiana⁵⁰, anti-inflamatória^{51,52}, anticonvulsivante⁵³, antimalárica⁵⁴, antitumoral^{55,56}, antituberculose⁵⁷, analgésica⁵⁸, dentre outras. Em muitos casos, as atividades biológicas apresentadas são atribuídas às propriedades quelantes destas moléculas.⁵⁹ Por sua vez, algumas hidrazonas demonstraram ser quelantes efetivos de ferro *in vitro* e *in vivo*, com potencial emprego no tratamento de desordens genéticas como a talassemia.^{60,61}

Por outro lado, complexos metálicos de hidrazonas apresentam potenciais aplicações como catalisadores⁶², sondas luminescentes⁶³ e sensores moleculares⁶⁴. Além disso, a literatura

⁴⁶ R. Manikandan, P. Viswanathamurthi, M. Muthukumar, Spectrochim. Acta, Part A 83 (2011) 297.

⁴⁷ J.J. Pinto, C. Moreno, M. Garcia-Vargas, Talanta 64 (2004) 562.

⁴⁸ N. Aggarwal, R. Kumar, C. Srivastva, P. Dureja, J.M. Khurana, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 3056.

⁴⁹ V. Getautis, M. Daskeviciene, T. Malinauskas, V. Jankauskas, J. Sidaravicius, Thin Solid Films 516 (2008) 8979.

⁵⁰ S.G. Küçükgülzel, A. Mazi, S. Sahin, S. Öztürk, J. Stables, Eur. J. Med. Chem. 38 (2003) 1005.

⁵¹ U. Salgin-Gökşen, N. Gökhan-Kelekçi, O. Göktas, Y. Köysal, E. Kiliç, Ş. Işık, G. Aktay, M. Ösalp, Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 5738.

⁵² P. Vicini, M. Incerti, I.A. Doytchinova, P. La Colla, B. Busonera, R. Loddo, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 624.

⁵³ J.R. Dimmock, S.C. Vashishtha, J.P. Stables, Eur. J. Med. Chem. 35 (2000) 241.

⁵⁴ P. Melnyk, V. Leroux, C. Sergheraert, P. Grellier, Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 31.

⁵⁵ N. Terzioglu, A. Gürsoy, Eur. J. Med. Chem. 38 (2003) 781.

⁵⁶ L. Savini, L. Chiasserini, V. Travagli, C. Pellerano, E. Novellino, S. Cosentino, M.B. Pisano, Eur. J. Med. Chem. 39 (2004) 113.

⁵⁷ K.-K. Bedia, O. Elçin, U. Seda, K. Fatma, S. Nathaly, R. Sevim, A. Dimoglo, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 1253.

⁵⁸ A.R. Todeschini, A.L.E. De Miranda, K.C.M. Da Silva, S.C. Parrini, E.J. Barreiro, Eur. J. Med. Chem. 33 (1998) 189.

⁵⁹ M.C. Rodríguez-Argüelles, R. Cao, A.M. García-Deibe, C. Pelizzi, J. Sanmartín-Matalobos, F. Zani, Polyhedron 28 (2009) 2187.

⁶⁰ J.L. Buss, J. Neuzil, P. Ponka, Biochem. Soc. Trans. 30 (2002) 755.

⁶¹ J.L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Ponka, Iron Chelation Ther. 509 (2002) 205.

⁶² O. Poralimardan, A.-C. Chamayou, C. Janiak, H. Hosseini-Monfared, Inorg. Chim. Acta 360 (2007) 1599.

⁶³ C. Basu, S. Chowdhury, R. Banerjee, H.S. Evans, S. Mukherjee, Polyhedron 26 (2007) 3617.

⁶⁴ M. Bakir, O. Green, W.H. Mulder, J. Mol. Struct. 873 (2008) 17.

mostra que a coordenação a metais, muitas vezes, leva a agentes farmacológicos mais potentes, incentivando a busca por novos complexos.^{65,66}

As hidrazonas derivadas de compostos acil ou aroil apresentam um sítio doador C=O (Figura 1.2). A presença deste sítio adicional as torna mais versáteis, devido ao seu grande potencial quelante, o qual tem atraído a atenção de muitos pesquisadores.^{46,67} Desta forma, uma grande variedade de complexos têm sido sintetizados a partir dessas hidrazonas, onde observa-se que a coordenação ocorre através das formas neutra ou aniônica, como ligantes bi- ou tridentados. No último caso, a presença de um anel heteroaromático nos grupos R1 ou R2 fornece um sítio de coordenação adicional.

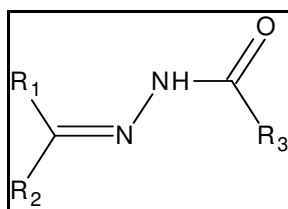


Figura 1.2. Estrutura genérica de acil/aróil hidrazonas.

A atividade antimicrobiana é verificada para uma grande variedade de acil e aroil hidrazonas e seus complexos. Rollas e colaboradores⁶⁸ estudaram o potencial antimicrobiano de uma série de hidrazonas provenientes de ácido 4-fluorbenzóico hidrazida, que foram testadas frente a colônias de bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e de fungos *C. albicans*. Os resultados mostraram que as hidrazonas inibem o crescimento das bactérias *S. aureus*, apresentando valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) na mesma faixa observada para o agente antibacteriano ceftriaxona. Por outro lado, as hidrazonas estudadas não apresentaram atividade satisfatória contra os demais microorganismos.

Mais recentemente, o nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade antimicrobiana de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina, bem como dos seus complexos de estanho(IV).⁶⁵ Neste trabalho, foram estudadas 2-acetilpiridina-fenil hidrazona (H2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenil hidrazona (H2AcpClPh), 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenil hidrazona (H2AcpNO₂Ph) e os complexos organoestânicos [(*n*-Bu)Sn(2AcPh)Cl₂] (**1**), [(*n*-Bu)Sn(2AcpClPh)Cl₂] (**2**),

⁶⁵ A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

⁶⁶ C.L. Donicci, M.H. Araujo, H.S. Oliveira, D.R.M. Moreira, V.R.A. Pereira, M.D. Souza, M.C.A.B. De Castro, A.C.L. Leite, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 5038.

⁶⁷ P.G. Avaji, C.H.V. Kumar, S.A. Patil, K.N. Shivananda, C. Nagaraju, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3552.

⁶⁸ S. Rollas, N. Gulerman, H. Erdeniz, Farmaco 57 (2002) 171.

[(*n*-Bu)Sn(2AcpNO₂Ph)Cl₂] (**3**) [(Ph)Sn(2AcPh)Cl₂] (**4**), [(Ph)Sn(2AcpClPh)Cl₂] (**5**) e [(Ph)Sn(2AcpNO₂Ph)Cl₂] (**6**). O estudo demonstrou que a complexação melhorou significativamente o perfil farmacológico das hidrazonas frente a *S. aureus*, enquanto os valores de CIM verificados para *C. albicans* não sofreram diminuição após a coordenação, exceto para os complexos (**3**) e (**6**), obtidos com H₂AcpNO₂Ph.

Em 2004, Walcourt e colaboradores⁶⁹ investigaram a atividade antimalárica de piridoxalisonicotinoil hidrazona (PIH), salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) e 2-hidroxi-1-naftaldeído isonicotinoil hidrazona (311), frente a parasitas sensíveis e resistentes à cloroquina. A determinação de IC₅₀ destes compostos revelou que a hidrazona 311 possui maior atividade que o agente antimalárico desferrioxamina, o qual apresenta atividade em humanos, apesar de não ser usado na clínica.

Por sua vez, a busca por fármacos com atividade antiproliferativa levou à descoberta de que muitas hidrazonas apresentam atividade contra células tumorais. Bernhardt e colaboradores⁷⁰ estudaram a atividade citotóxica de uma série de isonicotinoil hidrazonas, as quais apresentaram capacidade de coordenar-se ao ferro como ligantes tridentados. As moléculas estudadas apresentaram atividade seletiva contra células tumorais, a qual foi atribuída tanto à capacidade quelante das hidrazonas quanto à formação de quelatos altamente citotóxicos.

Vicini e colaboradores⁵² testaram uma série de benzo[*d*]isotiazol hidrazonas contra diversas linhagens de células humanas de tumores sólidos e hematológicos. Os resultados mostraram que alguns compostos testados apresentaram atividade citotóxica similar à do antineoplásico 6-mercaptopurina contra os tumores hematológicos testados.

Dentre os grupos de pesquisa empenhados no estudo das propriedades biológicas das hidrazonas no Brasil, encontra-se o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Este grupo é responsável pela descoberta de uma variedade de ações farmacológicas em diferentes hidrazonas. Atividades analgésicas⁷¹, vasodilatadoras⁷², anti-inflamatórias^{71,73} e anti-*Trypanosoma*⁷⁴ encontram-se entre as atividades verificadas por eles.

⁶⁹ A. Walcourt, M. Loyevsky, D.B. Lovejoy, V.R. Gordeuk, D.R. Richardson, Int. J. Biochem. Cell B 36 (2004) 401.

⁷⁰ P.V. Bernhardt, L.M. Caldwell, T.M. Chaston, P. Chin, D.R. Richardson, J. Biol. Inorg. Chem. 8 (2003) 866.

⁷¹ R.B. Lacerda, C.K.F. De Lima, L.L. Da Silva, N.C. Romeiro, A.L.P. Miranda, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 74.

⁷² A.G. Silva, G. Zapata-Sudo, A.E. Kummerle, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, R.T. Sudo, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 3431.

⁷³ J.L.M. Tributino, C.D. Duarte, R.S. Corrêa, A.C. Doriguetto, J. Ellena, N.C. Romeiro, N.G. Castro, A.L.P. Miranda, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 1125.

1.7 Tiossemicarbazonas e a Química Medicinal

As tiossemicarbazonas são compostos que apresentam a estrutura básica $R_1R_2C=N-(NH)-C=S(-N)R_3R_4$ (Figura 1.3) e constituem uma importante classe de ligantes N, S-doadores.⁷⁵

Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, com rendimentos satisfatórios e sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. A síntese de tiossemicarbazonas geralmente envolve a condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas, sendo comumente necessária a utilização de catálise ácida.^{76,77}

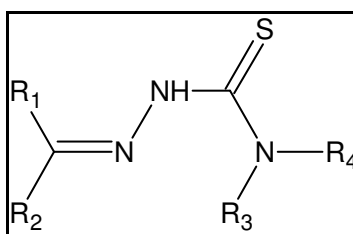


Figura 1.3. Estrutura genérica de tiossemicarbazonas.

Apesar de a Figura 1.3 apresentar o esqueleto das tiossemicarbazonas com ligações duplas e simples convencionais, as tiossemicarbazonas apresentam alta deslocalização eletrônica, principalmente quando grupos aromáticos encontram-se ligados ao carbono azometínico. Devido a esta deslocalização, as tiossemicarbazonas podem coexistir nas formas tiona ou tiol, em equilíbrio tautomérico.⁷⁶ Além disso, as tiossemicarbazonas geralmente encontram-se como mistura dos isômeros configuracionais *Z* e *E* em relação à ligação C=N, sendo que a preferência entre um isômero e outro depende da natureza dos grupos substituintes. De forma geral, as tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos tendem a formar preferencialmente o isômero *E*, conforme observado por Temperini e colaboradores para a 2-formilpiridina tiossemicarbazona.⁷⁸ Por outro lado, as tiossemicarbazonas derivadas de cetonas assimétricas apresentam uma proporção entre *Z* e *E* dependente dos substituintes ligados à carbonila.⁷⁶

⁷⁴ N.C. Romeiro, G. Aguirre, P. Hernández, M. González, H. Cerecetto, I. Aldana, S. Pérez-Silanes, A. Monge, E.J. Barreiro, L.M. Lima, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 641.

⁷⁵ T.S. Lobana, S. Khanna, G. Hundal, B.-J. Liaw, C.W. Liu, *Polyhedron* 27 (2008) 2251.

⁷⁶ R.P. Tenório, A.J.S. Góes, J.G. De Lima, A.R. De Faria, A.J. Alves, T.M. De Aquino, *Quim. Nova* 28 (2005) 1030.

⁷⁷ S. Cunha, T.L. Da Silva, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 2090.

⁷⁸ M.L.A. Terperini, M.R. Santos, V.R.P. Monteiro, *Spectrochim. Acta, Part A* 51 (1995) 1517.

Do ponto de vista biológico, as tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecidas por suas importantes aplicações na pesquisa de novos fármacos, em função de seu amplo espectro de ação. Dentre suas aplicações, podem-se citar suas atuações como agentes antitumorais⁷⁹, antimicrobianos⁸⁰, antivirais⁸¹, antimaláricos⁸², antituberculose⁸³ e antiparasitários⁸⁴.

A química de coordenação das tiossemicarbazonas foi inicialmente explorada durante princípios dos anos sessenta. Atualmente, as propriedades biológicas das tiossemicarbazonas são freqüentemente relatadas à coordenação com íons metálicos, a qual pode ocorrer através das formas neutra ou aniônica.⁸⁵

A atividade antitumoral das tiossemicarbazonas tem sido a mais estudada para esta classe de compostos. Esta propriedade é atribuída à capacidade que elas têm de inibir a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), a qual está envolvida na biossíntese do ácido desoxirribonucléico (ADN).⁸⁶ De fato, a RDR é atualmente considerada um alvo estratégico para o desenvolvimento de novos fármacos e as tiossemicarbazonas atuam bloqueando a ação da enzima e causando modificação na velocidade de mutação espontânea das células.^{87,88}

A hidroxiuréia (Figura 1.4-A) vem sendo utilizada na terapia do câncer por décadas, e atua através da inibição da RDR. No entanto, este composto apresenta um curto tempo de meia-vida no plasma, além de ser considerado um fraco bloqueador da atividade enzimática. Outro problema é o surgimento de células tumorais resistentes ao composto, tornando necessária a busca por novos fármacos.⁸⁹

⁷⁹ J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Da Silva, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671.

⁸⁰ M. Joseph, M. Kuriakose, M.R.P. Kurup, E. Suresh, A. Kishore, S.G. Bhat, *Polyhedron* 25 (2006) 61.

⁸¹ Y. Teitz, D. Ronen, A. Vansover, T. Stematsky, J.L. Riggs, *Antiviral Res.* 24 (1994) 305

⁸² D.L. Klayman, J.P. Scovill, J.F. Bartosevich, J. Bruce, *J. Med. Chem.* 26 (1983) 35.

⁸³ L. Bukowski, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopec, *Chem. Heterocyc. Compd.* 42 (2006) 1358.

⁸⁴ 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.

⁸⁵ T.S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 977.

⁸⁶ L. Zhu, B. Zhou, X. Chen, H. Jiang, J. Shao, Y. Yen, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 1178.

⁸⁷ A.J. Ocean, P. Christos, J.A. Sparano, D. Matulich, A. Kaubish, A. Siegel, M. Sung, M.M. Ward, N. Hamel, I. Espinoza-Delgado, Y. Yen, M.E. Lane, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 379.

⁸⁸ J. Shao, B. Zhou, A.J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 586.

⁸⁹ N. Saban, M. Bujak, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64 (2009) 213.

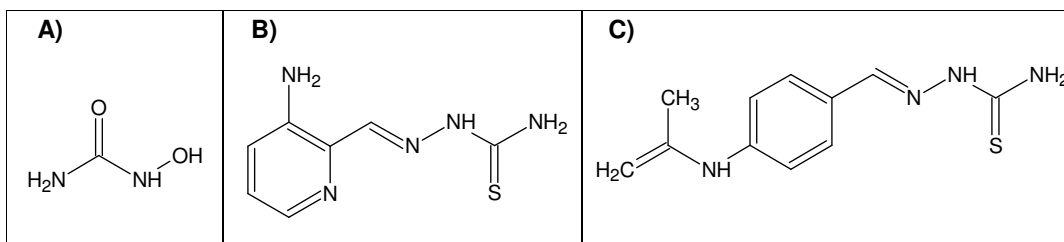


Figura 1.4. Representação estrutural A) da hidroxauréia, B) da triapina e C) da tiacetazona.

As tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas encontram-se entre os inibidores mais potentes da RDR, sendo até mil vezes mais ativas que a hidroxauréia. As características estruturais necessárias à atividade dessas moléculas foram investigadas por French e colaboradores⁹⁰. Desde então, várias tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas foram investigadas e apresentaram-se como bons inibidores da enzima. Entre os vários compostos da série, a 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, conhecida como Triapina (Figura 1.4-B), parece ser o composto mais promissor, apresentando atividade citotóxica contra diferentes células tumorais. Atualmente, os ensaios na fase clínica II da Triapina já foram concluídos para o tratamento de tumores de próstata, pâncreas, rins, ovário e pulmão, enquanto ensaios contra outros tumores encontram-se em fase clínica I e II.^{91,92}

Embora a atividade antitumoral das tiossemicarbazonas seja a mais investigada hoje em dia, a 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (tiacetazona, Figura 1.4-C) representa o único composto da classe em uso clínico, o qual é utilizado no tratamento da tuberculose. Porém, seu uso é limitado em decorrência da sua ação predominantemente bacteriostática, do rápido aparecimento de cepas resistentes durante o tratamento e dos efeitos colaterais observados, tais como a indução de diabetes mellitus.^{93,94} Outras tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeído *para*-substituído ou aldeídos heterocíclicos também manifestam atividade antituberculose *in vitro* e, em alguns casos, também *in vivo*.⁹⁵

Por sua vez, a atividade antibacteriana das tiossemicarbazonas e seus complexos também tem sido muito estudada. Em 1980, Dobek e colaboradores⁹⁶ estudaram a atividade antibacteriana de uma série de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina frente a isolados

⁹⁰ F.A. French, E.J. Blanz Junior, J. Med. Chem. 9 (1966) 585.

⁹¹ R.A. Finch, M. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y. Cheng, A.C. Sartorelli, Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 983.

⁹² <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=triapine> (acessado em 18 de outubro de 2011).

⁹³ H. Beraldo, D. Gambino, Mini-Rev. Med. Chem. 4 (2004) 159.

⁹⁴ H. Beraldo, Quim. Nova 27 (2004) 461.

⁹⁵ F.M. Collins, D.L. Klayman, N.E. Morrison, J. Gen. Microbiol. 128 (1982) 1349.

⁹⁶ A.S. Dobek, D.L. Klayman, E.T. Dickson Junior., J.P. Scovill, E.C. Tramont, Antimicrob. Agents Chemother. 18 (1980) 27.

clínicos de diversas bactérias. Os resultados mostraram que as tiossemicarbazonas foram capazes de inibir o crescimento de bactérias *gram*-positivas, mas apresentaram baixa atividade frente a bactérias *gram*-negativas. Anos mais tarde (2001), Kovala-Demertzi e colaboradores⁹⁷ mostraram que complexos de platina(II) de 2-acetilpiridina tiossemicarabazona apresentam comportamento similar, inibindo bactérias *gram*-positivas, mas mostrando-se inativos frente a bactérias *gram*-negativas.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a coordenação de tiossemicarbazonas a metais promove um aumento de diversas atividades biológicas, tais como: atividade antimicrobiana frente a bactéria *gram*-negativa *P. aeruginosa*⁹⁸ e atividade citotóxica frente a glioblastoma maligno⁹⁹ por compostos de gálio, atividade antimicrobiana de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas nos complexos de cobre,^{100,101} a atividade antichagásica de nitro tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona nos complexos de cobre,¹⁰² entre outras.

1.8 Lapachol e a Química Medicinal

O lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] (Figura 1.5) é um produto natural isolado de várias espécies de plantas da família Bignoniaceae, particularmente do gênero *Tabebuia*, sendo encontrado facilmente nas regiões norte e nordeste do Brasil.¹⁰³

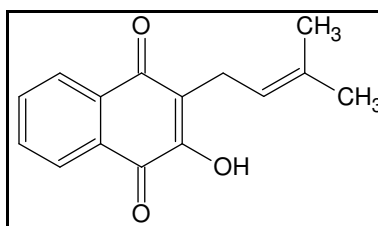


Figura 1.5. Estrutura do 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, lapachol.

O lapachol foi isolado pela primeira vez por Arnaudon, em 1858 e a primeira proposta de estrutura para este composto foi relatada por Paternòs vinte e quatro anos mais tarde, embora

⁹⁷ D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzi, J.R. Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 555.

⁹⁸ J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301.

⁹⁹ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

¹⁰⁰ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263.

¹⁰¹ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571.

¹⁰² A. Pérez-Rebolledo, L.R. Teixeira, A.A. Batista, A.S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. Gonzáles, P. Hernández, A.M. Ferreira, N.L. Speziali, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 939.

¹⁰³ K.O. Eyong, P.S. Kumar, V. Kuete, G.N. Folefoc, E.A. Nkengfak, S. Baskaran, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 5387.

com erros.^{104,105} No entanto, o grande conhecimento da química do lapachol deve-se em parte a uma longa série de publicações realizadas por Hooker e colaboradores, os quais estabeleceram a estrutura química dessa e outras naftoquinonas relacionadas.¹⁰⁵ Em 1927, o lapachol foi finalmente sintetizado por Fieser.¹⁰⁶

Conhecido por suas propriedades anticancerígenas¹⁰⁵, o lapachol e seus derivados apresentam ainda um grande número de bioatividades, tendo efeitos contra *Biomphalaria glabrata*¹⁰⁷, *Trypanosoma cruzi*¹⁰⁸, atividade antimicrobiana¹⁰⁹ e atividade antimalárica¹¹⁰. Essa classe de compostos apresenta também atividade anti-inflamatória¹¹¹, analgésica¹¹² e antiulcerogênica¹¹³.

No que se refere à ação antineoplásica do lapachol, é aceita a existência de uma relação entre a atividade do composto e a capacidade que as quinonas possuem de inibir a oxidação e a fosforilação mitocondrial, bem como de inibir a oxidase succínica.¹¹⁴

Embora estudos mostrem que o lapachol apresenta atividade antitumoral¹¹⁵, ensaios clínicos na fase I revelaram que uma concentração plasmática efetiva para que ocorra um efeito terapêutico é obtida apenas com administração de doses elevadas do composto.¹¹⁶ Nestes casos, observa-se o surgimento de efeitos colaterais como náusea, vômito e efeito anticoagulante. Por estas razões, os estudos clínicos com o lapachol foram interrompidos.^{105,116} Por outro lado, estudos pré-clínicos *in vivo* demonstram que o lapachol apresenta atividade antimetastática quando baixas concentrações são utilizadas e nenhum efeito tóxico é observado.^{105,117} Desta forma, o lapachol tem sido investigado como possível agente antimetastático.

¹⁰⁴ E.N. Da Silva Junior, M.C.F.R. Pinto, K.C.G. De Moura, C.A. De Simone, C.J. Nascimento, C.K.Z. Andrade, A.V. Pinto, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 1575.

¹⁰⁵ H. Hussain, K. Krohn, V.U. Ahmad, G.A. Miana, I.R. Green, *Arkivoc* 2 (2007) 145.

¹⁰⁶ L.F. Fieser, *J. Am. Chem. Soc.* 49 (1927) 857.

¹⁰⁷ N.M.F. Lima, C.S. Correia, P.A.L. Ferraz, A.V. Pinto, M.C.R.F. Pinto, A.E.G. Santana, M.O.F. Goulart, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 822.

¹⁰⁸ C. Salas, R.A. Tapia, K. Ciudad, V. Armstrong, M. Orellana, U. Kemmerling, J. Ferreira, J.D. Maya, A. Morello, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 668.

¹⁰⁹ M.A.A. De Souza, A.R. Da Silva, M.A. Ferreira, M.J. De Lemos, R.G. Ramos, A.B. Ferreira, S.R. De Souza, *Quim. Nova* 31 (2008) 1670.

¹¹⁰ L.H. Carvalho, E.M.M. Rocha, D.S. Raslan, A.B. Oliveira, A.U. Krettli, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21 (1998) 485.

¹¹¹ E.R. De Almeida, A.A. Da Silva Filho, E.R. Dos Santos, C.A.C. Lopes, *J. Ethnopharmacol.* 29 (1990) 239.

¹¹² J.D. Grazziotin, E.E.S. Schapoval, C.G. Chavesa, J. Gleyeb, A.T. Henriques, *J. Ethnopharmacol.* 36 (1992) 249.

¹¹³ R.K. Goel, N.K.R. Pathak, M. Biswas, V.B. Pandey, A.K. Sanyal, *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (1987) 138.

¹¹⁴ E.L. Araújo, J.R.B. Alencar, *Rev. Bras. Farmacogn.* 12 (2002) 57.

¹¹⁵ K.V. Rao, T.J. McBride, J.J. Oleson, *Cancer Res.* 28 (1968) 1952.

¹¹⁶ M. Maeda, M. Murakami, T. Takegami, T. Ota, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229 (2008) 232.

¹¹⁷ I.T. Balassiano, S.A. De Paulo, N.H. Silva, M.C. Cabral, M.G.C. Carvalho, *Oncol. Rep.* 13 (2005) 329.

1.9 Desenvolvimento de Metalofármacos

Diversos compostos orgânicos usados na medicina não apresentam um modo de ação puramente orgânico. Alguns são ativados ou biotransformados por íons metálicos, enquanto outros apresentam um efeito direto ou indireto no metabolismo do metal.¹¹⁸ Além disso, muitos candidatos a fármacos falham nos testes clínicos em razão de suas pobres características farmacocinéticas, ou seja, a incapacidade da droga atingir seu alvo biológico *in vivo*.¹¹⁹

A Química Bioinorgânica e a Química Inorgânica Medicinal têm oferecido novas possibilidades para a pesquisa com compostos de coordenação. Os metais, em particular metais de transição, oferecem algumas vantagens potenciais sobre os fármacos mais comuns baseados em compostos orgânicos, incluindo a ampla possibilidade de números de coordenação e geometrias, a variedade de estados de oxidação e a grande diversidade estrutural.¹²⁰ Além disso, uma característica dos metais é que eles são bons aceptores de elétrons, tornando comum a coordenação e interação destes com espécies ricas em elétrons, tais como proteínas e o ADN.⁸

De forma geral, os metais podem coordenar-se a ligantes em uma configuração tridimensional, onde a molécula pode reconhecer e interagir com um alvo molecular determinado. Além disso, metais de transição possuem diferentes estados de oxidação, o que permite-lhes participar de processos biológicos redox.¹¹⁹ Outros fatores importantes da coordenação de moléculas orgânicas a metais são: as propriedades intrínsecas do íon metálico e do ligante, a possibilidade de troca de ligante, o que permite ao metal coordenar-se e interagir com moléculas biológicas e o possível aumento da lipofilicidade pela coordenação de um composto orgânico ao metal, facilitando a passagem do composto através das membranas biológicas por difusão passiva.^{118,121} Desta forma, a coordenação pode alterar significativamente o perfil farmacológico dos compostos, podendo levar a uma diminuição da resistência celular, visto que os mecanismos de resistência que reconhecem um composto orgânico podem não reconhecê-lo quando complexado a um cátion metálico. Alguns efeitos colaterais também podem diminuir com a complexação, além de poder ocorrer um sinergismo metal-ligante, o qual está diretamente relacionado com a diminuição de doses.⁹ Devido a essas características, uma ampla gama de aplicações médicas de complexos metálicos tem sido investigada e vários artigos de revisão relatam os recentes avanços deste campo.^{122,123,124,125}

¹¹⁸ S. Ahmad, A.A. Isab, S. Ali, A.R. Al-Arfaj, Polyhedron 25 (2006) 1633.

¹¹⁹ S.P. Fricker, Dalton Trans. (2007) 4903.

¹²⁰ S.H. Van Rijt, P.J. Sadler, Drug Discov. Today 14 (2009) 1089.

¹²¹ P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, Curr. Opin. Chem. Biol. 12 (2008) 197.

¹²² H. Sakurai, Y. Kojima, Y. Yoshikawa, K. Kawabe, H. Yasui, Coord. Chem. Rev. 226 (2002) 187.

¹²³ T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, Chem. Soc. Rev. 35 (2006) 534.

Considerando que as atividades farmacológicas dos complexos dependem do íon metálico, do ligante coordenado e da estrutura dos compostos formados, é de fundamental importância o estudo do *design* dos compostos, visando o alvo biológico de interesse.

1.9.1 Gálio: atividade farmacológica e uso na medicina

O gálio é um elemento do grupo 13 utilizado na clínica como agente terapêutico e de diagnóstico. Compostos contendo esse metal mostram-se eficazes no tratamento de diversos distúrbios, tais como reabsorção óssea acelerada, doenças autoimunes, alguns tipos de cânceres e doenças infecciosas.^{126,127}

Embora o gálio não apresente nenhuma função fisiológica conhecida, estudos revelam que ele é capaz de interagir com processos celulares e proteínas biologicamente importantes.¹²⁸ O íon gálio(III) apresenta similaridades com o ferro(III), no que diz respeito à sua eletronegatividade, afinidade eletrônica, raio iônico e geometria de coordenação. No entanto, ao contrário do ferro(III), o gálio(III) não é reduzido em condições fisiológicas. Estas características suportam a idéia de que o gálio(III) pode interferir no metabolismo celular do ferro.^{129,130} De fato, estudos recentes sugerem que o gálio é transportado para o interior das células pela transferrina e, uma vez dentro das células, o íon gálio(III) pode competir com o ferro(III) presente na enzima RDR, substituindo-o. Esta hipótese tem sido considerada a rota mais provável na ação farmacológica deste metal, incluindo sua atividade anticancerígena.¹²⁹

Atualmente, o gálio é o segundo metal mais utilizado no tratamento de câncer, depois da platina. O seu uso clínico ocorre pela administração de nitrato de gálio(III), $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. No entanto, o nitrato de gálio hidrolisa-se facilmente em meio biológico, formando óxidos de gálio insolúveis e bloqueando a absorção e a penetração dos íons gálio(III) na membrana.

A complexação do íon gálio(III) com moléculas orgânicas tem sido considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de fármacos inibidores de tumores, apresentando vantagens sobre os sais de gálio, tais como maior biodisponibilidade e eficácia.¹³¹ Considerando-se que as hidrazonas também apresentam atividade antitumoral relatada⁵⁵, a

¹²⁴ H. Ali, J.E. van Lier, Chem. Rev. 99 (1999) 2379.

¹²⁵ W.A. Volkert, T.J. Hoffman, Chem. Rev. 99 (1999) 2269.

¹²⁶ D. Chen, M. Frezza, R. Shakya, Q.C. Cui, V. Milacic, C.N. Verani, Q.P. Dou, Cancer Res. 67 (2007) 9258.

¹²⁷ G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, F. Refosco, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 56.

¹²⁸ C.R. Chitambar, Int. J. Environ. Res. Public Health 7 (2010) 2337.

¹²⁹ S. Gomez-Ruiz, B. Gallego, M.R. Kaluderović, H. Kommera, E. Hey-Hawkins, R. Paschke, G.N. Kaluderovic, J. Organomet. Chem. 694 (2009) 2191.

¹³⁰ P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Crit. Rev. Oncol. Hemat. 42 (2002) 283.

¹³¹ A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M.A. Jakupc, V.B. Arion, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1819.

obtenção de complexos de gálio com esses ligantes pode gerar compostos com atividades citotóxicas superiores às verificadas para o ligante livre e o sal de partida, justificando a busca por esses complexos.

Knorr e Chitambar sintetizaram um complexo de gálio com piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) e avaliaram sua atividade antiproliferativa frente as células de leucemia humana CCRF-CEM.¹³² Os resultados revelaram que o complexo apresentou superior inibição do crescimento celular quando comparado com o sal de partida $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e a hidrazona livre. Além disso, os pesquisadores verificaram que a adição de ferro exógeno no meio de cultura reverte a citotoxicidade do $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e da PIH, mas apresenta um menor efeito na toxicidade do complexo de gálio. Estes resultados incentivam a busca por complexos de gálio com hidrazonas como potenciais agentes antineoplásicos.

As propriedades antimicrobianas do gálio também são atribuídas à habilidade do íon de entrar nas células alvo através do mecanismo de transporte de ferro e, assim, perturbar o metabolismo do ferro no organismo.¹³³ Sais de gálio, como o malonato de gálio(III)¹³⁴ e o nitrato de gálio(III)⁴², bem como compostos de gálio(III) com outras moléculas orgânicas^{98,135} são relatados como potenciais agentes antimicrobianos, incentivando o desenvolvimento e estudo de novos complexos.

Nos últimos anos, complexos de gálio estão sendo desenvolvidos ainda para estudos de atividade antimalárica, onde os resultados mostram que muitos complexos apresentam atividade frente a *Plasmodium falciparum*, o agente causador da doença.^{136,137,138} No entanto, não foram encontrados na literatura estudos de atividade antimalárica para complexos de gálio de hidrazonas, como o realizado neste trabalho.

1.9.2 Zinco: atividade farmacológica e uso na medicina

O zinco, um elemento do grupo 12, era utilizado desde a Antiguidade, sob a forma de óxido de zinco, para curar feridas e queimaduras.¹³⁹ No final do século XIX, foi descoberto que o

¹³² G.M. Knorr, C.R. Chitambar, *Anticancer Res.* 18 (1998) 1733.

¹³³ J.E. Moore, A. Murphy, B.C. Millar, A. Loughrey, P.J. Rooney, J.S. Elborn, C.E. Goldsmith, *J. Microbiol. Meth.* 76 (2009) 201.

¹³⁴ J.R. Harrington, R.J. Martens, N.D. Cohen, L.R. Bernstein, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29 (2006) 121.

¹³⁵ L.R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 665.

¹³⁶ J.A. Ocheskey, S.E. Harpstrite, A. Oksman, D.E. Golberg, V. Sharma, *Chem. Commun.* (2005) 1622.

¹³⁷ V.F. De Andrade-Neto, M.O.F. Goulart, J.F. Da Silva Filho, M.J. Da Silva, M.C.F.R. Pinto, A.V. Pinto, M.G. Zalis, L.H. Carvalho, A.U. Krettli, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1145.

¹³⁸ J.A. Ocheskey, V.R. Polyakov, S.E. Harpstrite, A. Oksman, D.E. Goldberg, D. Piwnica-Worms, V. Sharma, *J. Inorg. Biochem.* 93 (2003) 265.

¹³⁹ F.A. De Azevedo, A.A.M. Chasin (2003) *Metais: Gerenciamento da Toxicidade*. São Paulo: Editora Atheneu.

zinco era indispensável ao crescimento do fungo *Aspergillus niger*. Porém, ele foi reconhecido como indispensável para a vida humana quase um século mais tarde por Prasad e colaboradores.¹⁴⁰

Hoje em dia, o zinco é considerado um elemento essencial para plantas¹⁴¹, animais¹⁴² e microorganismos¹⁴³. Ele é o segundo metal de transição mais abundante no organismo depois do ferro, podendo ser encontrado nos ossos, músculos e diferentes órgãos do corpo humano.¹⁴⁴ Além disso, o zinco é um constituinte estrutural e funcional essencial a um grande número de macromoléculas e reações enzimáticas, sendo o único metal presente em todas as seis classes de enzima (oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases).¹⁴¹

Embora o zinco seja encontrado na Tabela Periódica no mesmo grupo dos metais cádmio e mercúrio, ambos tóxicos, ele apresenta toxicidade em humanos extremamente baixa. Por outro lado, a perda deste elemento traço leva a problemas mais graves e generalizados, como retardo do crescimento em crianças e adolescentes, hipogonadismo em homens, perda de apetite, letargia mental, dentre outros.^{140,141,145}

Considerando a baixa toxicidade do zinco e sua essencialidade, muitos estudos são voltados para a busca de fármacos contendo este metal e diversas formulações farmacêuticas contendo zinco já são utilizadas na clínica (Figura 1.6). Sais de zinco são usados por via oral para tratar doenças metabólicas graves, como a doença de Wilson, uma doença hereditária caracterizada pelo acúmulo de cobre no cérebro e no fígado.¹⁴⁶ Por sua vez, piritionato de zinco é usado em xampus para tratar seborréia, enquanto propionato de zinco e caprilato de zinco são usados como agentes antifúngicos tópicos.¹⁴⁷ Dermodex[®], um fármaco contendo óxido de zinco, é empregado no tratamento de dermatites¹⁴⁸ e estudos recentes demonstram o potencial anti-inflamatório de complexos de zinco¹⁴⁹.

¹⁴⁰ T. Fukada, S. Yamasaki, K. Nishida, M. Murakami, T. Hirano, J. Biol. Inorg. Chem. 16 (2011) 1123.

¹⁴¹ M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux, New Phytol. 173 (2007) 677.

¹⁴² A.S. Prasad, Mol. Med. 14 (2008) 353.

¹⁴³ B. Sugarman, Rev. Infect. Dis. 5 (1983) 137.

¹⁴⁴ L.M. Plum, L. Rink, H. Haase, Int. J. Environ. Res. Public Health 7 (2010) 1342.

¹⁴⁵ A.S. Prasad, J. Am. Coll. Nutr. 28 (2009) 257.

¹⁴⁶ M.L. Schilsky, Biochimie, 91 (2009) 1278

¹⁴⁷ T. Nogrady, D.F. Weaver (2005) Medicinal Chemistry: A molecular and biochemical approach. New York: Oxford University Press, 3^a Ed.

¹⁴⁸ H.V. Worthington, J.E. Clarkson, O.B. Eden, Cochrane Database Syst. Rev. (2007) CD000978.

¹⁴⁹ C.T. Dillon, T.W. Hambley, B.J. Kennedy, P.A. Lay, Q. Zhou, N.M. Davies, J.R. Biffin, H.L. Regtop, Chem. Res. Toxicol. 16 (2003) 28.

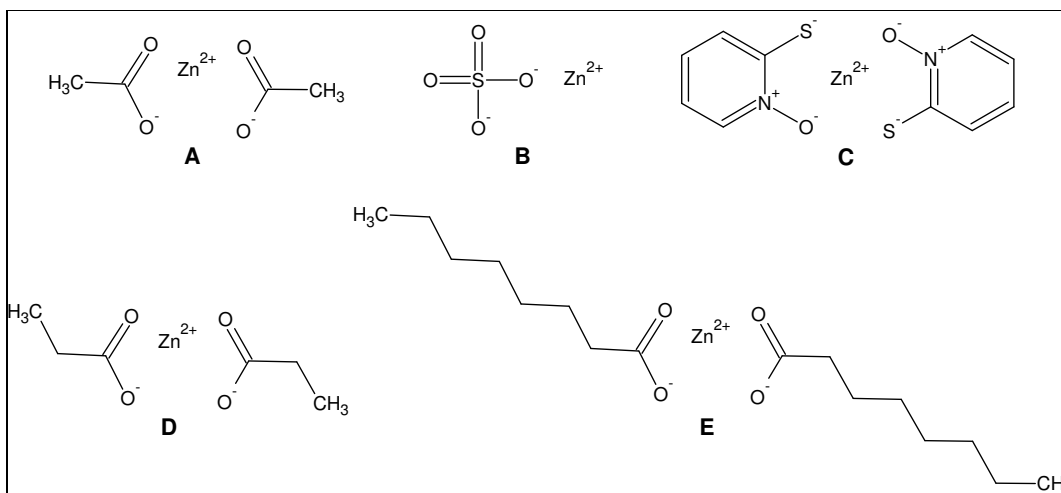


Figura 1.6. Estruturas de fármacos contendo zinco. A) Acetato de zinco; B) sulfato de zinco utilizados no tratamento de doença de Wilson; C) piritionato de zinco utilizado no tratamento de seborréia; D) propionato de zinco e E) caprilato de zinco usados como antifúngicos tópicos.

Desta forma, o desenvolvimento de compostos de zinco tem se apresentado promissor na busca por fármacos com baixa toxicidade e, neste sentido, a coordenação de moléculas orgânicas com potencial atividade farmacológica ao zinco pode ser uma boa estratégia para a obtenção de compostos seguros e eficazes.

1.9.3 Bismuto: atividade farmacológica e uso na medicina

O bismuto, presente no grupo 15, é o elemento estável mais pesado da tabela periódica, com o isótopo ^{209}Bi ocorrendo naturalmente. Esse metal apresenta dois estados de oxidação principais, bismuto(III) e bismuto(V). O bismuto trivalente apresenta número de coordenação altamente variável (3 a 10) e seus compostos apresentam geometria irregular, enquanto a maioria dos compostos de bismuto(V) são pentacoordenados.^{150,151}

Embora o bismuto seja considerado um metal pesado, ele apresenta toxicidade aceitável, contrastando com outros metais pesados como, por exemplo, arsênio e chumbo, que são altamente tóxicos. Além disso, o bismuto não apresenta efeito carcinogênico, possibilitando o uso clínico desse metal.¹⁵²

O uso de compostos de bismuto na medicina é verificado desde a Idade Média. No entanto, o primeiro relato da administração sistêmica de compostos de bismuto ocorreu em 1786 por Louis Odier, o qual empregou o metal para o tratamento de dispepsia.^{150,151} Desde então,

¹⁵⁰ P.J. Sadler, H. Li, H. Sun, *Coord. Chem. Rev.* 185-186 (1999) 689.

¹⁵¹ N. Yang, H. Sun, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 2354.

¹⁵² M. Mehring, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 974.

diversos compostos de bismuto foram investigados para o tratamento de uma variedade de doenças e alguns foram introduzidos na clínica. Atualmente, o maior uso de compostos de bismuto na medicina é decorrente de suas atividades antimicrobiana e antitumoral.¹⁵¹

Com relação ao efeito antimicrobiano, compostos de bismuto têm sido utilizados no tratamento de várias infecções microbianas como no tratamento de feridas, sífilis, colite, dispepsia, diarreia e úlceras pépticas.^{151,153} O uso mais importante dos compostos de bismuto ocorre no tratamento de doenças do trato gastrointestinal, as quais estão relacionadas à bactéria *Helicobacter pylori*, principal causa de úlceras gástrica e duodenal.^{154,155} Três compostos são amplamente utilizados no tratamento desses distúrbios gástricos: subsalicilato de bismuto (BSS), o subcitrato de bismuto coloidal (CBS) e o citrato de bismuto/ranitidina (RBC). Embora o mecanismo de ação dos compostos de bismuto ainda não seja esclarecido, estudos farmacológicos sugerem que o tratamento e a prevenção de úlceras por esses compostos envolvem a proteção da mucosa gástrica, o estímulo de processos citoprotetores e a ação antimicrobiana contra *H. pylori*.¹⁵³

Com relação à atividade antitumoral, o potencial terapêutico dos compostos de bismuto estende-se para o tratamento de tumores e redução de efeitos colaterais de outros fármacos.¹⁵³ A atividade antitumoral tem sido demonstrada para complexos de bismuto de uma variedade de ligantes como, por exemplo, ditiocarbamatos¹⁵⁶ e tiolatos¹⁵⁷. Além disso, o radioisótopo ²¹³Bi é considerado um potencial agente radioterapêutico e compostos desse radioisótopo têm sido usados para o tratamento de leucemia e câncer de próstata.^{158,159}

Estudos recentes mostraram que o subnitrato de bismuto (BSN) é capaz de reduzir os efeitos colaterais da cisplatina através do aumento de metalotioneína nos rins.^{160,161} Esta proteína apresenta um importante papel na proteção contra a toxicidade de metais pesados, agentes alquilantes e radicais livres.¹⁶² Além disso, a administração de citrato junto com BSN induz um aumento na concentração de metalotioneína em até 30 vezes comparado à adição de BSN

¹⁵³ G.G. Briand, N. Burford, Chem. Rev. 99 (1999) 2601.

¹⁵⁴ R. Ge, H. Sun, Acc. Chem. Res. 40 (2007) 267.

¹⁵⁵ H. Lu, D.Y. Graham, Drug Discov. Today Dis. Mech. 3 (2006) 431.

¹⁵⁶ R. Huang, A. Wallqvist, D.G. Covell, Biochem. Pharmacol. 69 (2005) 1009.

¹⁵⁷ P. Köpf-Maier, T. Klapötke, Inorg. Chim. Acta 152 (1988) 49.

¹⁵⁸ M.R. McDevitt, T.N. Nikuta, R.D. Finn, M.J. Curcio, O.A. Gansow, M.W. Geerlings Sr., S.M. Larson, D.A. Scheinberg, Tumor Target. 2 (1996) 182.

¹⁵⁹ J.C. Jurcic, M.R. McDevitt, G. Sgouros, A.M. Ballangrud, R.D. Finn, D. Ma, K. Hamacher, M.W. Geerlings Sr., J.L. Humm, M.W. Brechbiel, R. Molinet, C. Apostolidis, S.M. Larson, D.A. Scheinberg, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 18 (1999) 17a.

¹⁶⁰ Y. Kondo, M. Satoh, N. Imura, M. Akimoto, Cancer Chemother. Pharmacol. 29 (1991) 19.

¹⁶¹ Y. Kondo, S. Himeno, M. Satoh, A. Naganuma, T. Nishimura, N. Imura, Cancer Chemother. Pharmacol. 53 (2004) 33.

¹⁶² M. Sato, M. Kondoh, Tohoku J. Exp. Med. 196 (2002) 9.

sozinho.¹⁶¹ Assim, a aplicação de compostos de bismuto na terapia do câncer também está relacionada com a habilidade desses compostos de reduzir os efeitos colaterais de fármacos antitumorais sem interferir na atividade dos mesmos.

1.9.4 Antimônio: atividade farmacológica e uso na medicina

O antimônio é um elemento do grupo 15 utilizado na medicina e em cosméticos desde a Antiguidade. Hoje em dia, porém, o principal uso clínico de compostos de antimônio é no tratamento de *leishmanioses*, o qual iniciou-se com a descoberta de Gaspar de Oliveira Vianna, em 1912, de que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da leishmanioses tegumentar americana.¹⁶³ Desde então, novos compostos a base de antimônio(III) foram desenvolvidos e utilizados na clínica. No entanto, estes compostos apresentavam vários efeitos colaterais, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotoxicos, fazendo com que muitos pacientes interrompessem o tratamento.¹⁶⁴

Com o tempo, o uso de antimoniais trivalentes começou a ser substituído por compostos de antimônio pentavalentes, onde propõe-se que o antimônio(V) atua como uma pró-droga. Estudos sugerem que tióis celulares atuam como agentes redutores para a conversão de antimônio(V) a antimônio(III), a forma ativa e tóxica no organismo do hospedeiro.^{165,166} Atualmente, encontram-se em uso clínico o gluconato de antimônio(V), comercializado nos países de língua inglesa, e o antimoniato de meglumina, comercializado no Brasil e nos países de língua francesa e espanhola.^{17,163}

Com o intuito de explorar ao máximo o potencial terapêutico dos antimoniais, outros estudos farmacológicos vêm sendo realizados, como, por exemplo, aqueles das atividades citotóxica^{167,168} e antimicrobiana^{169,170} de complexos de antimônio. Por sua vez, *Leishmania* e *Trypanosoma* apresentam muitas similaridades bioquímicas, tais como o conteúdo de enzimas glicosomais¹⁷¹ e a abundância de cisteína proteases, as quais possuem papéis importantes na virulência dos parasitas, na modulação da resposta imune dos hospedeiros e na diferenciação do

¹⁶³ F. Frézard, C. Demicheli, R.R. Ribeiro, *Molecules* 14 (2009) 2317.

¹⁶⁴ S. Rath, L.A. Trivelin, T.R. Imbrunito, D.M. Tomazela, M.N. De Jesús, P.C. Marzal, H.F. De Andrade Jr., A.G. Tempone, *Quim. Nova* 26 (2003) 550.

¹⁶⁵ F. Frézard, C. Demicheli, C.S. Ferreira, M.A.P. Costa, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 913.

¹⁶⁶ S. Yan, F. Li, K. Ding, H. Sun, *J. Biol. Inorg. Chem.* 8 (2003) 689.

¹⁶⁷ S. Wyllie, A.H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 257.

¹⁶⁸ S.K. Hadjikakou, I.I. Ozturk, M.N. Xanthopoulou, P.C. Zachariadis, S. Karkabounas, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1007.

¹⁶⁹ H.P.S. Chauhan, U.P. Singh, *Appl. Organometal. Chem.* 20 (2006) 404.

¹⁷⁰ N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1176.

¹⁷¹ F.R. Opperdoes, J.-P. Szikora, *Mol. Biochem. Parasitol.* 147 (2006) 193.

parasita.¹⁷² Estas similaridades têm estimulado também a busca por antimoniais com atividade anti-*Trypanosoma*.^{173,174}

1.9.5 Estanho: atividade farmacológica e uso na medicina

Durante os últimos 50 anos, a química organometálica passou a constituir uma ampla e importante área da química, já que compostos organometálicos têm encontrado aplicações práticas industriais e agrícolas.¹⁷⁵ Junto a isso, no fim dos anos setenta, o descobrimento das atividades antitumorais de titanoceno e de alguns derivados diorganoestânicos estimulou muito o interesse na busca por compostos organometálicos.¹⁷⁶

Atualmente, sais de estanho são bem conhecidos por suas inúmeras aplicações biológicas. No entanto, esses compostos frequentemente são muito tóxicos, o que justifica a busca por novos complexos.^{177,178} Dentre as atividades farmacológicas demonstradas para os compostos organoestânicos, uma das mais investigadas é sua atividade citotóxica. Complexos de estanho com uma variedade de ligantes como benzoatos, fenilacetatos e cinamatos apresentam atividade contra diversas linhagens de células tumorais *in vitro* e *in vivo*.^{179,180,181} O nosso grupo de pesquisa também tem relatado a atividade antitumoral de complexos de estanho com tiossemicarbazonas, e suas propriedades de indução de apoptose.¹⁸²

Por sua vez, a atividade antimicrobiana, em especial antifúngica, dos compostos de estanho é bastante conhecida.¹⁸³ Em trabalhos recentes, Mendes e colaboradores^{184,185} estudaram as atividades citotóxicas e antimicrobianas de diferentes complexos de estanho(IV) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida. Os resultados obtidos sugerem que as

¹⁷² J.C. Mottram, D.R. Brooks, G.H. Coombs, *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (1998) 455.

¹⁷³ 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.

¹⁷⁴ 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.

¹⁷⁵ H. Yin, J. Cui, Y. Qiao, *Inorg. Chem. Commun.* 11 (2008) 684.

¹⁷⁶ P. Yang, M. Guo, *Coord. Chem. Rev.* 185 (1999) 189.

¹⁷⁷ B. Raychaudhury, S. Banerjee, S. Gupta, R.V. Singh, S.C. Datta, *Acta Trop.* 95 (2005) 1.

¹⁷⁸ L. Pellerito, L. Nagy, *Coord. Chem. Rev.* 224 (2002) 111.

¹⁷⁹ M. Kemmer, H. Dalil, M. Biesemans, J.C. Martins, B. Mahieu, E. Horn, D. De Vos, E.R.T. Tiekink, R. Willem, M. Gielen, *J. Organomet. Chem.* 608 (2000) 63.

¹⁸⁰ M. Gielen, *Appl. Organomet. Chem.* 16 (2002) 481.

¹⁸¹ S. Tabassum, C. Pettinari, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 1781.

¹⁸² A. Perez-Rebolledo, J. D. Ayala, G. M. de Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C. L. Zani, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467.

¹⁸³ A.G. Davies, M. Gielen, K.H. Pannell, E.R.T. Tiekink (2008) *Tin Chemistry: Fundamentals, Frontiers, and Applications*. Wiley, West Sussex.

¹⁸⁴ 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.

¹⁸⁵ I.C. Mendes, F.B. Costa, G.M. De Lima, J.D. Ardisson, I. Garcia-Santos, A. Castiñeiras, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 1179.

tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida apresentam um perfil farmacológico interessante, podendo ser úteis como agentes citotóxicos e antimicrobianos. Além disso, a coordenação ao estanho(IV) mostrou-se interessante para o aumento destes efeitos farmacológicos, mostrando-se uma boa estratégia de redução de dose.

1.10 O Presente Trabalho

No presente trabalho foram sintetizados complexos de zinco(II) com hidrazonas anti-inflamatórias derivadas de salicilaldeído, os quais foram avaliados em modelos animais de inflamação aguda e de nocicepção periférica e central. A escolha do metal foi decorrente de sua baixa toxicidade e do seu caráter essencial para uma variedade de reações enzimáticas. Estas reações são responsáveis por mediar uma ampla faixa de processos fisiológicos, dentre os quais a modulação de funções imunorregulatórias e de células inflamatórias.¹⁸⁶ Desta forma, o zinco pode ser considerado um importante agente imunorregulatório com atividade anti-inflamatória.

Uma série de compostos de gálio(III) com diferentes hidrazonas também foi sintetizada. Visto que ambos, hidrazonas e gálio, apresentam algumas atividades farmacológicas similares, os complexos foram desenvolvidos com o intuito de verificar o efeito da complexação nas atividades antitumoral, antimicrobiana e antimalárica das hidrazonas. Conforme mencionado anteriormente, essas atividades são verificadas para uma variedade de complexos de gálio, onde observa-se que a complexação pode apresentar um efeito sinérgico metal-ligante e/ou influenciar na biodisponibilidade do gálio em seu alvo de ação, aumentando sua atividade biológica.¹³¹

Complexos de antimônio(III) e estanho(IV) foram obtidos com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina. A atividade das tiossemicarbazonas é comumente aumentada pela complexação, onde o conhecimento das propriedades do ligante e do metal pode levar a sínteses de compostos altamente ativos. No entanto, complexos de tiossemicarbazonas com metais que não são de transição (representativos) têm recebido menor atenção de pesquisadores.¹⁸⁷ Uma vez que os antimoniais apresentam atividade antiparasitária, investigamos a atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* dos compostos obtidos. A avaliação da citotoxicidade dos compostos também foi realizada, com o intuito de obter seu índice terapêutico.

¹⁸⁶ P.D. Zalewski, A.Q. Truong-Tran, D. Grosser, L. Jayaram, C. Murgia, R.E. Ruffin, *Pharmacol. Ther.* 105 (2005) 127.

¹⁸⁷ E. López-Torres, A.R. Cowley, J.R. Dilworth, *Inorg. Chem. Commun.* 10 (2007) 724.

O efeito da coordenação ao estanho(IV) sobre a atividade antifúngica das tiossemicarbazonas foi avaliada em cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*.

Finalmente, tendo em vista o amplo perfil farmacológico do lapachol, que inclui propriedades anti-inflamatórias, nos interessamos também em sintetizar complexos metálicos com esta naftoquinona. Complexos de lapachol e seus derivados têm sido amplamente investigados na literatura.^{188,189} No entanto, complexos de gálio(III) e bismuto(III) de lapachol não foram relatados.

Estudos revelam que o nitrato de gálio pode suprimir encefalomielite autoimune experimental e prevenir artrite inflamatória adjuvante através da supressão da função de macrófagos e células T em modelos animais.^{190,191} Além disso, o nitrato de gálio pode suprimir lúpus, uma doença autoimune que resulta em inflamação e danos teciduais.¹⁹² Por sua vez, o bismuto tem se mostrado eficiente contra duas desordens gastrointestinais inflamatórias: úlcera péptica e diarreia. Além disso, investigações sobre a atividade anti-inflamatória do subgalato de bismuto (BSG) sugerem que o BSG apresenta efeito pela supressão de óxido nítrico e prostaglandina E₂, os quais são importantes mediadores em processos inflamatórios.¹⁹³ Assim, considerando os potenciais efeitos do gálio e bismuto na inflamação, nós investigamos o efeito da complexação desses metais ao lapachol em um modelo animal de angiogênese inflamatória.

Com o intuito de avaliar a influência de algumas propriedades físico-químicas nas atividades farmacológicas apresentadas pelos compostos investigados, estudos de relação estrutura-atividade (SAR) foram realizados, sempre que possível.

O trabalho consistiu, portanto, em um estudo do efeito da coordenação de compostos orgânicos bioativos a diferentes metais e da investigação das propriedades antitumorais, antimicrobianas e antiparasitárias dos diferentes compostos. Com relação ao desenvolvimento de novos compostos anti-inflamatórios, foi também estudada a atividade anti-inflamatória de alguns complexos de zinco com hidrazonas e a atividade anti-angiogênica de complexos de lapachol.

¹⁸⁸ R. Hernández-Molina, I. Kalinina, P. Esparza, M. Sokolov, J. Gonzalez-Platas, A. Estévez-Braun, E. Pérez-Sacau, *Polyhedron* 26 (2007) 4860.

¹⁸⁹ F. Caruso, M.A. Martínez, M. Rossi, A. Goldberg, M.E.C. Villalba, P.J. Aymonino, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 3529.

¹⁹⁰ C. Whitacre, G. Apseoff, K. Cox, V. Matkovic, S. Jewell, N. Gerber, *J. Neuroimmunol.* 39 (1992) 175.

¹⁹¹ V. Matkovic, A. Balboa, D. Clinchot, C. Whitacre, B. Zwilling, D. Brown, S.E. Weisbrode, G. Apseoff, N. Gerber, *Curr. Ther. Res.* 50 (1991) 255.

¹⁹² G. Apseoff, K.V. Hackshaw, C. Whitacre, S.E. Weisbrode, N. Gerber, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356 (1997) 517.

¹⁹³ C.-H. Lin, Y.-H. Shen, S.-H. Wu, C.-H. Lin, S.-M. Hwang, Y.-C. Tsai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 830.

Capítulo 2. Parte Experimental

2.1 Materiais, Equipamentos e Procedimentos

2.1.1 Reagentes e Solventes

As reações foram realizadas utilizando reagentes com alto grau de pureza e solventes P.A. As *N*-acil hidrazonas nomeadas “LASSBio” foram fornecidas pelo Prof. Dr. Eliezer Barreiro, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. LASSBio é a sigla de “Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas”. O lapachol foi fornecido pela Prof^a. Dr^a. Lucienir Duarte e pela Prof^a. Dr^a. Gracia Divina de Fátima Silva, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Os demais reagentes e os solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Merck, Synth, Vetec, Quimex e Strem Chemicals). Os solventes deuterados utilizados foram de procedência CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

2.1.2 Pesagens

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica Mettler AE 163, precisão 0,0001g.

2.1.3 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados utilizando-se o equipamento Mettler FP 90.

2.1.4 Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas em dois locais diferentes: no Departamento de Química da UFMG e na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP. Em ambos os casos, utilizou-se o equipamento CHN 2400, Perkin Elmer.

2.1.5 Análise Condutimétrica

O equipamento utilizado nas medidas de condutividade molar foi um condutímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante 0,088 cm⁻¹. As medidas foram feitas a partir de soluções de concentração 1,0 x 10⁻³

mol L⁻¹ dos compostos, utilizando-se dimetilformamida (DMF) como solvente. Os resultados foram analisados conforme a atribuição sugerida por Geary¹, a qual é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Atribuição do tipo de eletrólito¹ para soluções de concentração 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹

Solvente	Λ_M (cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹)	Tipo de eletrólito
DMF	65-90	1:1
	130-170	2:1
	200-240	3:1

2.1.6 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, alocado no Departamento de Química da UFMG. Os espectros foram registrados nas regiões 4000-400 e 710-200 cm⁻¹, empregando pastilhas de KBr ou emulsões de nujol em janelas de CsI.

2.1.7 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) e Bruker DPX-200 (200 MHz) localizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Departamento de Química da UFMG. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO-*d*₆ ou CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna em tubos de 5 mm de diâmetro externo.

2.1.8 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram obtidas na Termobalança Shimadzu-TGA50H, a qual encontra-se alocada no Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de N₂, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 750 °C.

2.1.9 Difração de Raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos de antimônio(III) foram determinadas em colaboração com os pesquisadores Prof. Dr. Nivaldo Speziali, do Departamento de Física da UFMG e a Prof^a. Dr^a. Isolda Maria de Castro Mendes, da Escola de Belas Artes da UFMG. A

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

tiossemicarbazona $H_2Bz_4oNO_2Ph$ e os complexos de estanho(IV) tiveram suas estruturas determinadas pelo aluno de doutorado Jeferson Gomes da Silva, do Departamento de Química da UFMG, com supervisão do Prof. Dr. Nivaldo Speziali. As demais estruturas cristalográficas foram determinadas através da colaboração com os pesquisadores Dr. Oscar Piro, da Universidad Nacional de La Plata, Argentina e Dr. Eduardo Castellano, do Instituto de Física de São Carlos, USP. Os detalhes e as condições experimentais de cada medida são descritas nos capítulos correspondentes.

2.2 Obtenção de Ligantes e Complexos

2.2.1 Síntese de complexos de zinco(II) com as *N*-acil hidrazonas $H_2LASSBio-466$ e $H_2LASSBio-1064$

Os ligantes salicilaldeído 2-clorobenzoil hidrazona ($H_2LASSBio-466$) e salicilaldeído 4-clorobenzoil hidrazona ($H_2LASSBio-1064$) foram fornecidos pelo Prof. Dr. Eliezer Barreiro. Essas hidrazonas foram complexadas com zinco(II) para a formação dos complexos $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$ (**1**), $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$ (**2**) e $[Zn(LASSBio-1064)]_2$ (**3**).

Os complexos (**1**) e (**2**) foram obtidos reagindo-se quantidades equimolares da hidrazona desejada com cloreto de zinco(II) ($ZnCl_2$) e trietilamina em etanol. Por sua vez, o complexo (**3**) foi obtido reagindo-se em metanol a hidrazona $H_2LASSBio-1064$ com acetato de zinco(II) na proporção 1:1 metal:ligante. A mistura foi submetida a refluxo por 6 h, sendo filtrada após este período. Os produtos formados foram lavados com éter etílico e secados sob pressão reduzida. A caracterização dos complexos foi realizada por meio de seus pontos de fusão, por análise elementar, medidas de condutividade molar, por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN).

A estrutura cristalográfica de $H_2LASSBio-466$ foi determinada após recristalização da hidrazona em DMSO:acetona 1:9. Cristais do complexo $[Zn(LASSBio-1064)H_2O]_2 \cdot [Zn(LASSBio-1064)(DMSO)_2]_2$ (**2a**) adequados para análise de raios X de monocristal também foram obtidos a partir da recristalização do complexo (**2**) em solução de DMSO:acetona 1:9.

2.2.2 Obtenção de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Foram preparados os compostos 2-acetilpiridina-fenil hidrazona (H_2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenil hidrazona ($H_2AcPcClPh$), 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenil hidrazona (H_2AcPnO_2Ph) e seus análogos 2-benzoilpiridina-fenil hidrazona (H_2BzPh),

2-benzoilpiridina-*para*-clorofenil hidrazona (H2BzpClPh) e 2-benzoilpiridina-*para*-nitrofenil hidrazona (H2BzpNO₂Ph).

As hidrazonas foram obtidas a partir da reação de condensação de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina com a hidrazida desejada, conforme descrito na literatura.^{2,3,4,5}

Foram reagidos 10 mmol da cetona desejada (2-acetilpiridina ou 2-benzoilpiridina) com quantidade equimolar de benzoidrazida, 4-clorobenzoidrazida e 4-nitrobenzoidrazida em etanol. Adicionaram-se 2 gotas de ácido acético à mistura reacional, a qual foi mantida em refluxo sob constante agitação por 7 h. O sólido obtido foi filtrado e lavado com etanol e, posteriormente, éter etílico. O composto foi secado sob pressão reduzida. Os produtos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY e HMQC.

2.2.3 Obtenção dos complexos de gálio(III) com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Foram obtidos seis complexos de gálio com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina: [Ga(2AcPh)₂]NO₃·H₂O (**1**), [Ga(2AcPcClPh)₂]NO₃·H₂O (**2**), [Ga(2AcPNO₂Ph)₂]NO₃·1,5H₂O (**3**), [Ga(2BzPh)₂]NO₃·2H₂O (**4**), [Ga(2BzpClPh)₂]NO₃·2H₂O (**5**) e [Ga(2BzpNO₂Ph)₂]NO₃·H₂O (**6**).

Os complexos de gálio(III) foram obtidos a partir da reação de 2 mmol da hidrazona desejada com 1 mmol de nitrato de gálio(III), Ga(NO₃)₃·xH₂O, em etanol. A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 7 horas. Após este período, o precipitado formado foi isolado por filtração a vácuo e lavado com etanol e éter etílico. Em seguida, o sólido foi secado em estufa e, posteriormente, sob pressão reduzida.

Os complexos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, termogravimetria, medidas de condutividade molar, espectroscopia de infravermelho e RMN.

Após cristalização lenta, cristais do complexo [Ga(2AcPh)₂]⁺ (**1a**) foram obtidos a partir do filtrado inicial, os quais foram adequados para medidas de difração de raios X. Além disso, cristais adequados para a difração de raios X de [H₂2AcPNO₂Ph]NO₃·H₂O, contendo a hidrazona

² T.E. Khalil, L. Labib, M.F. Iskander, Polyhedron 13 (1994) 2569.

³ S. Choudhary, J.R. Morrows, Angew. Chem. Int. Ed. 41 (2002) 4096.

⁴ A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

⁵ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 2117.

protonada no nitrogênio heteroaromático, foram obtidos da solução etanólica proveniente da síntese de $[\text{Ga}(\text{2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**3**).

2.2.4 *Obtenção do complexo de gálio(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)*

O complexo de gálio(III) $[\text{Ga}(\text{Lp})_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), onde Lp representa uma molécula de lapachol desprotonada, foi obtido conforme método descrito a seguir.

Em um balão contendo 3 mmol de lapachol e 20 mL de etanol foi adicionado 1 mmol de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ previamente dissolvido em 10 mL de etanol. A mistura foi submetida a refluxo por 6 h, permanecendo sob agitação por 24 h. O produto formado foi filtrado, lavado com etanol e éter etílico e secado sob pressão reduzida.

A caracterização do complexo formado foi realizada através de ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar, termogravimetria e seus espectros de infravermelho e RMN.

2.2.5 *Obtenção do complexo de bismuto(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)*

A obtenção do complexo de bismuto(III) $[\text{Bi}(\text{Lp})_2] \cdot \text{Cl}$ (**2**) ocorreu reagindo-se 3 mmol de lapachol com 1 mmol de cloreto de bismuto(III) (BiCl_3) em etanol, juntamente com 3 mmol de acetato de sódio. A mistura foi submetida a refluxo por 6 h, permanecendo sob agitação por aproximadamente 24 h. O produto formado foi lavado com etanol e éter etílico e secado sob pressão reduzida.

O complexo foi caracterizado por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por meio de seus espectros de infravermelho e RMN.

2.2.6 *Obtenção de N(4)-orto-clorofenil, N(4)-orto-fluorofenil e N(4)-orto-nitrofenil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina*

As tiossemicarbazonas já estão descritas na literatura⁶ e a obtenção das mesmas ocorreu por meio de duas etapas.

Na primeira etapa foi sintetizado o precursor 2-acetilpiridina hidrazona. Foram reagidos 20 mmol de 2-acetilpiridina com 32,5 mmol (excesso de 30 %) de hidrazina monoidratada em metanol. A mistura foi feita em banho de gelo, sendo submetida à agitação por 48 h. Após este

⁶ D. L. Klayman, J. F. Bartosevich, T. S. Griffin, C. J. Mason, J. P. Scovill, J. Med. Chem. 22 (1979) 855.

período, a solução foi levada ao congelador por 24 h, observando-se a presença de sólido branco. O produto formado foi filtrado e lavado com metanol gelado e éter etílico. Em seguida, o composto foi secado ao ar. A hidrazona foi caracterizada por RMN de ^1H para identificação e verificação de pureza.

A segunda etapa consistiu da preparação de 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofenil (H2Ac4oCℓPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-fluorofenil (H2Ac4oFPh) e 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofenil (H2Ac4oNO₂Ph) tiossemicarbazonas pelo método descrito a seguir.

Em um balão contendo 10 mmol de 2-acetilpiridina hidrazona e 30 mL de metanol foi adicionada quantidade equimolar de *o*-clorofenil, *o*-fluorofenil ou *o*-nitrofenil isotiocianato. A mistura foi mantida sob constante agitação por 24 h. O sólido obtido foi filtrado e lavado com metanol e, posteriormente, éter etílico. O composto foi secado sob pressão reduzida. As tiossemicarbazonas foram caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN.

2.2.7 Obtenção de *N*(4)-*orto*-clorofenil, *N*(4)-*orto*-fluorofenil e *N*(4)-*orto*-nitrofenil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina

2-Benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-fluorofenil e 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofenil tiossemicarbazonas são inéditas. Porém, 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofenil tiossemicarbazona já encontra-se descrita na literatura.⁷ A obtenção das tiossemicarbazonas foi realizada em duas etapas, conforme descrito a seguir.

Na primeira etapa foram obtidos os precursores *N*(3)-*orto*-clorofenil, *N*(3)-*orto*-fluorofenil e *N*(3)-*orto*-nitrofenil tiossemicarbazida. Estes precursores foram preparados reagindo-se 10 mmol de *o*-clorofenil, *o*-fluorofenil ou *o*-nitrofenil isotiocianato com 13 mmol (30 % de excesso) de hidrazina monoidratada em metanol. A mistura foi mantida em banho de gelo, sob agitação constante por 24 h. O produto foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico e secado sob pressão reduzida. As tiossemicarbazidas obtidas foram caracterizadas por ponto de fusão e RMN de ^1H para verificar sua obtenção e pureza.

Na segunda etapa, foram preparados os ligantes 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofenil (H2Bz4oCℓPh), 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-fluorofenil (H2Bz4oFPh) e 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofenil (H2Bz4oNO₂Ph) tiossemicarbazonas. Estas tiossemicarbazonas foram obtidas a partir de reação entre as tiossemicarbazidas *orto*-substituídas

⁷ D. X. West, N. M. Kozub, G. A. Bain, *Transit. Metal Chem.* 21 (1996) 52.

e 2-benzoilpiridina, em quantidades equimolares. A mistura reacional permaneceu 6 a 7 horas sob refluxo em metanol, sendo necessária a adição de duas gotas de H₂SO₄.

As tiossemicarbazonas obtidas foram caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN. Após recristalização em DMSO, monocristais de H₂Bz₄oNO₂Ph adequados para raios X foram obtidos.

2.2.8 Obtenção dos complexos de antimônio(III) de tiossemicarbazonas *N*(4)-orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Os complexos de antimônio(III) [Sb(2Ac₄oClPh)Cl₂] (**1**) [Sb(2Ac₄oFPh)Cl₂] (**2**), [Sb(2Ac₄oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [Sb(2Bz₄oClPh)Cl₂] (**4**) [Sb(2Bz₄oFPh)Cl₂] (**5**) e [Sb(2Bz₄oNO₂Ph)Cl₂] (**6**) foram obtidos a partir das sínteses descritas a seguir.

Em um balão contendo 1,5 mmol da tiossemicarbazona *N*(4)-orto-substituída desejada e 15 mL de metanol foram acrescentados 1,5 mmol de SbCl₃, previamente dissolvidos em 10 mL de metanol. A mistura foi submetida a 6 horas de refluxo e o sólido formado foi filtrado e lavado com metanol e éter etílico. Em seguida, o composto foi secado sob pressão reduzida.

As caracterizações dos complexos formados foram realizadas através de seus pontos de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por meio de seus espectros de infravermelho e RMN.

Cristais dos complexos [Sb(2Ac₄oClPh)Cl₂] (**1**) e [Sb(2Ac₄oFPh)Cl₂] (**2**) foram obtidos a partir de solução de DMSO-*d*₆, os quais foram adequados para medidas de difração de raios X.

2.2.9 Obtenção dos complexos de estanho(IV) de tiossemicarbazonas *N*(4)-orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Os complexos de estanho(IV) [Sn(2Ac₄oClPh)(*n*-Bu)Cl₂] (**7**), [Sn(2Ac₄oFPh)(*n*-Bu)Cl₂] (**8**), [Sn(2Ac₄oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (**9**), [Sn(2Bz₄oClPh)(*n*-Bu)Cl₂] (**10**), [Sn(2Bz₄oFPh)(*n*-Bu)Cl₂] (**11**) e [Sn(2Bz₄oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (**12**) foram preparados conforme descrito a seguir.

Em um balão contendo 1,5 mmol da tiossemicarbazona *N*(4)-orto-substituída desejada e 20 mL de etanol foi adicionada quantidade equimolar de [Sn(*n*-Bu)Cl₃]. A mistura foi submetida a 7 horas de refluxo e o produto formado foi isolado por filtração e lavado com etanol e éter etílico. Os compostos foram secados sob pressão reduzida. Os complexos obtidos foram

caracterizados por seus pontos de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por meio de seus espectros de infravermelho e RMN.

Cristais dos complexos $[\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7),
 $[\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]\text{DMSO}$ (8a), $[\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9),
 $[\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12) foram obtidos após a recristalização dos compostos em DMSO- d_6 .

2.3 Ensaios Biológicos

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados de forma quantitativa pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), através do método de macrodiluição em série.⁸

A atividade antimicrobiana dos complexos de gálio(III) foi avaliada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e contra o fungo *Candida albicans* (ATCC18804) em nosso laboratório de pesquisa. Por sua vez, a atividade antifúngica dos complexos de estanho(IV) foi realizada contra as cepas *Candida albicans* (ATCC18804), *Candida krusei* (ATCC200298), *Candida glabrata* (ATCC90030) e *Candida parapsilosis* (ATCC22019) no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em colaboração com o Prof. Dr. Daniel de Assis Santos.

Os testes de sensibilidade foram realizados seguindo os padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).^{8,9} As cepas das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram inoculadas em caldo Mueller Hinton, enquanto os fungos *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram inoculados em caldo Sabouraud. Em todos os testes, os microorganismos foram incubados a 37 °C por períodos de 18 a 24 h.

A efetividade antimicrobiana foi determinada por diluições sucessivas em tubos contendo 2,0 mL de meio de cultura (Mueller Hinton para as bactérias e Sabouraud para os fungos), os quais foram inoculados com 100 µL de cultura com turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland⁹. A diluição dos compostos foi realizada previamente em DMSO, e em

⁸ National Committee for Clinical Laboratory Standards, Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, in: NCCLS Document M7-A6, Pennsylvania, USA, 2003, ISBN: 1-56238-486-4.

⁹ 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).

seguida, transferida para o meio de cultura adequado, onde a concentração de DMSO não excedeu 1 % em nenhum tubo.

Em paralelo, foram realizados os controles positivo e negativo. O primeiro consiste de tubos contendo apenas o meio de cultura e o microorganismo de interesse, enquanto o segundo refere-se a tubos contendo o microorganismo crescendo na presença de tetraciclina (para as bactérias) ou fluconazol (para para os fungos).

Os testes foram realizados em triplicata e as leituras para a determinação das CIMs dos compostos foram realizadas após 20 h de incubação a 37 °C.

2.3.2 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

A avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Imunidade do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os estudos foram realizados por meio de uma parceria com a Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira.

2.3.2.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos Swiss adultos com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 g cada. Os animais foram fornecidos pela unidade de criação BIOECN-UFAL e distribuídos em grupos de 6 a 8 animais para o tratamento. Os camundongos foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com acesso livre à comida e água. Os experimentos foram conduzidos em sala com temperatura entre 25 e 28 °C, a qual está de acordo com a zona de termoneutralidade para roedores.¹⁰ Todos os animais foram manipulados seguindo as normas estabelecidas pela Comissão de Ética da UFAL para manipulação de animais (número de protocolo: 026681/2009-23).

2.3.2.2 Teste de constrição

O teste de constrição foi realizado conforme descrito por Collier e colaboradores.¹¹

Goma arábica foi utilizada como veículo. Ácido acético 0,6 % v/v (0,1 mL 10 g⁻¹) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 40 minutos após a administração *per os* (oral) dos compostos estudados. Os protótipos indometacina e dipirona foram administrados por via *per os*

¹⁰ C.J. Gordon, *Physiol. Behav.* 47 (1990) 963.

¹¹ H.O.J. Coollier, L.C. Dinneen, C.A. Johnson, C. Schneider, *Brit. J. Pharmacol.* 32 (1968) 295.

a uma dose equivalente a $100 \mu\text{mol Kg}^{-1}$. O grupo controle foi tratado com 10 mL Kg^{-1} de veículo.

O número de constrições, uma resposta que consiste de contração da parede abdominal e rotação pélvica seguida de extensão dos membros posteriores, foi avaliado através de observação constante durante 20 minutos, a qual iniciou 5 minutos após a injeção de ácido acético (ver Figura 2.1). A atividade antinociceptiva foi expressa como porcentagem de inibição do número de constrições com relação ao número de constrições observado nos animais do grupo controle.

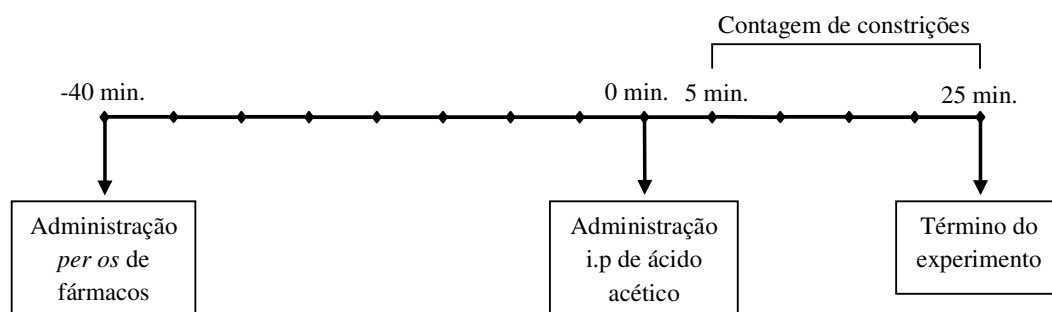


Figura 2.1. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por ácido acético em camundongos.

2.3.2.3 Avaliação de atividade nociceptiva induzida por formaldeído

O teste do formaldeído foi realizado em camundongos Swiss, conforme descrito por Hunskaar e Hole.¹²

Goma arábica foi utilizada como veículo. Solução de formaldeído 2,5 % (20 μL) foi administrada por via subcutânea na região dorsal da pata posterior direita. Os protótipos e a indometacina foram administrados por via *per os* 40 minutos antes da injeção do formaldeído, utilizando-se uma concentração de $100 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ de cada composto. Os animais do grupo controle foram tratados com 10 mL Kg^{-1} de veículo.

O tempo de lambida da pata gasto pelos animais após a injeção do formaldeído foi monitorado e considerado como indicativo de nocicepção. Desta forma, os animais foram observados de 0 a 5 minutos (fase neurogênica) e de 15 a 30 minutos (fase inflamatória) após a injeção (Figura 2.2).

¹² S. Hunskaar, K. Hole, Pain 30 (1987) 103.

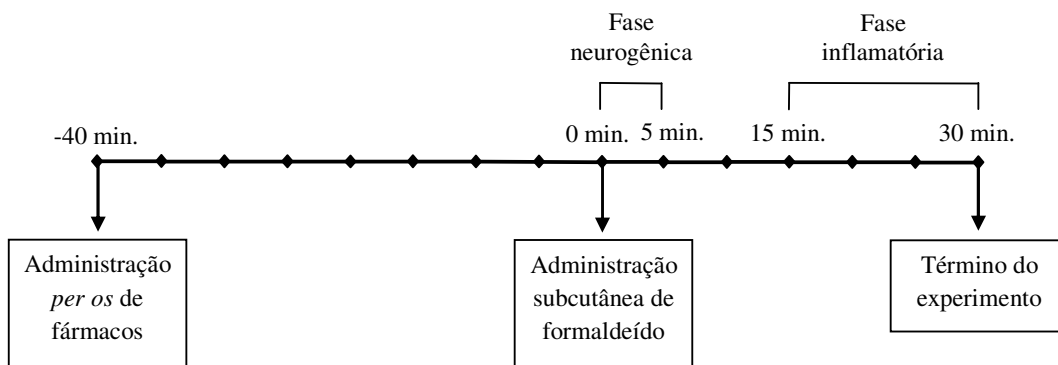


Figura 2.2. Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos.

2.3.2.4 Teste da placa quente

Os animais utilizados no teste da placa quente foram tratados segundo o método descrito por Eddy e Leimbach.¹³

Os protótipos foram administrados por via *per os* na dose de $100 \mu\text{mol Kg}^{-1}$, enquanto o grupo controle recebeu 10 mL Kg^{-1} de veículo (goma arábica, *per os*). Morfina foi utilizada como fármaco padrão na dose de $15 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ (i.p.).

Neste experimento, cada camundongo foi colocado em um conjunto de placa quente com temperatura de $54,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$. O tempo de lambida das patas foi determinado antes e 30 minutos após a administração dos compostos avaliados (Figura 2.3). Analgesia foi definida como um aumento na latência da lambida de pata e os tempos de latência foram comparados com os valores obtidos para o grupo controle. Sessenta segundos foram determinados como tempo de corte para evitar danos no tecido do animal.

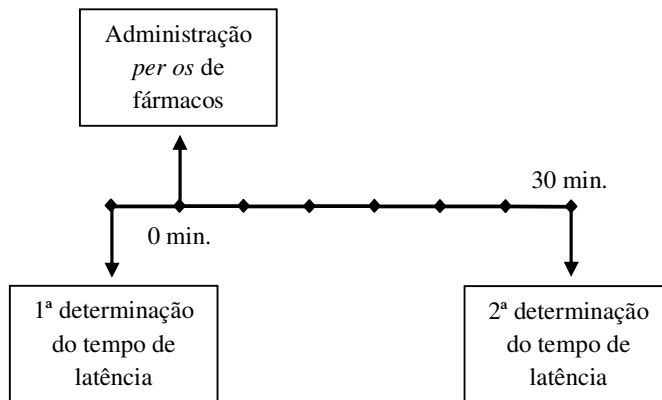


Figura 2.3. Avaliação da resposta nociceptiva no modelo da placa quente.

¹³ N.B. Eddy, D. Leimbach, J. Pharmacol. Exp. Ther. 107 (1953) 385.

2.3.2.5 Teste de peritonite induzida por zimosano

Inflamação peritoneal foi induzida conforme descrito por Doherty.¹⁴

Uma solução de zimosano $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada em solução salina 0,9 % de NaCl e injetada na cavidade peritoneal do animal (0,5 mL). Uma dose de $100 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ dos protótipos foi administrada por via *per os* 40 minutos antes da injeção do zimosano. Seis horas após a injeção de zimosano, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 3,0 mL de solução de Hank fria (Figura 2.4). O grupo controle foi tratado com 10 mL Kg^{-1} de veículo administrado por via *per os* (goma arábica). Indometacina foi administrada como fármaco padrão na dose de $100 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ (*per os*).

O número de células foi quantificado utilizando um microscópio óptico com lente de 100 X.

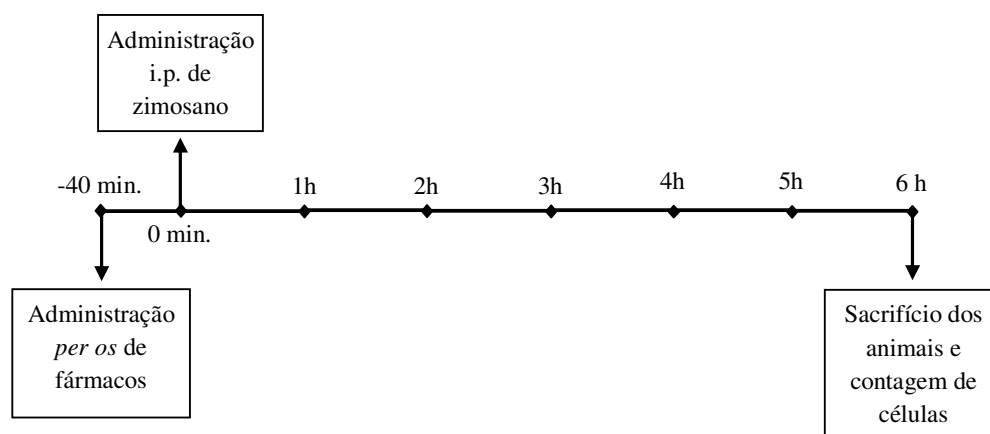


Figura 2.4. Avaliação do potencial anti-inflamatório dos compostos na peritonite induzida por zimosano em camundongos.

2.3.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos dos experimentos animais são apresentados como valor medido \pm erro padrão da medida (SEM). As diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo controle foram avaliadas pelo teste t de Student ou ANOVA no tutorial Prisma[®]. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $*P < 0,05$; $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$.

¹⁴ N.S. Doherty, P. Poubelle, P. Borgeat, T.H. Beaver, G.L. Westrich, N.L. Schrader, Prostaglandins 30 (1985) 769.

2.3.3 Atividade citotóxica contra células de glioblastoma

A avaliação da atividade citotóxica dos compostos contra células de glioblastoma foi realizada no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) de Belo Horizonte, em colaboração com a Dr^a. Raquel Gouveia dos Santos.

2.3.3.1 Linhagem de células e condições de cultura

As células tumorais de glioblastoma U87 (célula que expressa a proteína p53) e T98 (célula que expressa a proteína p53 mutante) e as células de fibroblastos de pulmão de feto humano (MRC5) foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC, USA). As células foram crescidas no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (50 U mL⁻¹ de penicilina/50 µM de estreptomicina), sob uma atmosfera de 5 % CO₂/95 % ar a 37 °C por 12 horas.

2.3.3.2 Avaliação da atividade antitumoral

A citotoxicidade foi quantificada através do ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), o qual mede a viabilidade metabólica celular.¹⁵ O MTT é um sal de coloração amarela que é reduzido apenas por desidrogenases mitocondriais de células vivas, formando o formazan, um produto de coloração roxa insolúvel em água.¹⁶

As células foram tratadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações dos compostos ($1,0 \times 10^{-12}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), os quais foram previamente dissolvidos em DMSO de modo que a concentração deste solvente no meio DMEM fosse sempre inferior a 0,05 %. Após 48 horas de incubação a 37 °C, MTT 0,5 mg mL⁻¹ foi adicionado em cada poço. Após mais 4 horas de incubação, DMSO foi adicionado para dissolver o formazan precipitado. A absorvância das soluções resultantes foi medida a 570 nm, absorção característica do formazan. A Figura 2.5 apresenta um esquema da parte experimental descrita acima.

Etoposídeo, um fármaco antineoplásico que inibe a enzima topoisomerase II, foi utilizado como controle negativo, enquanto DMSO 0,5 % em DMEM foi usado como controle positivo.

Todos os testes foram realizados em triplicata e valores de IC₅₀ foram calculados como a concentração de composto capaz de induzir 50 % de citotoxicidade.

¹⁵ J.A. Plumb, R. Milroy, S.B. Kaye, Cancer Res. 49 (1989) 4435.

¹⁶ T. Mosmann, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55.

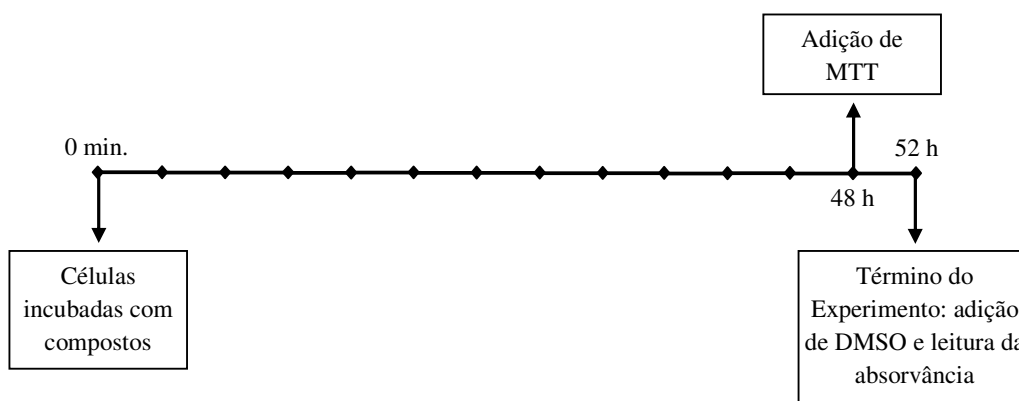


Figura 2.5. Avaliação da atividade antitumoral dos compostos frente a células de glioblastoma *in vitro*.

2.3.3.3 Análise morfológica de células tumorais

As mudanças morfológicas das células foram observadas após 48 horas de tratamento por microscopia de contraste de fase, utilizando um microscópio TS100 (Nikon).

Alterações no DNA foram detectadas por 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI). Após 48 horas de tratamento com 10^{-9} mol L⁻¹ dos compostos, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 70 % de metanol a temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram incubadas com $0,4 \times 10^{-6}$ g mL⁻¹ de DAPI (Sigma) por 1 hora ao abrigo de luz e, em seguida, lavadas com PBS. Alterações no DNA, tais como condensação da cromatina e fragmentação do DNA foram observadas por microscópio de fluorescência (Nikon 385-410).

2.3.4 Atividade antimalárica

A atividade antimalárica das hidrazonas e seus complexos de gálio(III) foi avaliada no Centro de Pesquisa René Rachou, Fiocruz, de Belo Horizonte. Estes estudos foram realizados através de parceria com a Dr^a. Antoniana Ursine Krettl.

2.3.4.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Parasitas *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina e sensíveis à mefloquina foram mantidos a 37 °C em cultura de eritrócitos humanos, conforme método previamente descrito.¹⁷ Os parasitas foram mantidos em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) suplementado com 10 % de soro humano, 2 % de glutamina e 7,5 % de NaHCO₂, em placas de cultura cujo o meio foi trocado diariamente. Com o intuito de obter um predomínio

¹⁷ W. Trager, J.B. Jensen, Science 193 (1976) 673.

de formas jovens na cultura, utilizou-se o protocolo de sincronização com D-sorbitol descrito na literatura.¹⁸

2.3.4.2 Avaliação de atividade antimalárica

A proteína rica em histidina 2 (HRP2) encontra-se naturalmente em muitos compartimentos celulares, incluindo o citoplasma de *P. falciparum*. Assim, a produção desta proteína por *P. falciparum* está associada com o desenvolvimento e proliferação do parasita.¹⁹ Uma vez que HRP2 é um marcador altamente sensível de *P. falciparum*, o efeito antimalárico dos protótipos foi determinado pela inibição do crescimento parasitário através do teste imunoenzimático ELISA anti-HRP2.¹⁹

As culturas de *P. falciparum* foram incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações dos compostos estudados por 72 horas, sob as mesmas condições de cultura descritas no item anterior (sessão 2.3.4.1). Após este período, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes para a lise total de eritrócitos e 100 µL de cada poço foi transferido para outra placa para a realização do teste ELISA. Esta placa foi anteriormente revestida com o anticorpo primário anti-HRP2 durante uma noite, a 4 °C e, em seguida seu conteúdo foi substituído por 200 µL de solução de PBS/BSA 2 %, a qual foi descartada após 2 horas de incubação. Após as culturas hemolizadas terem sido transferidas para a placa ELISA previamente revestida, as microplacas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Este conteúdo foi então descartado e um segundo anticorpo (MPFG55P-ICLLAB[®], 100 µL/poço) foi adicionado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB, 100 µL/poço) foi acrescentado e os poços incubados por 15 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µL L⁻¹ de solução de ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹. A figura 2.6 apresenta um esquema da parte experimental descrita acima.

O efeito antimalárico dos compostos estudados foi determinado pela leitura da absorvância em 450 nm. Os estudos de cada composto foram realizados em triplicata.

¹⁸ C. Lambros, J.P. Vanderberg, J. Parasitol. 65 (1979) 418.

¹⁹ H. Noedl, W.H. Wernsdorfer, R.S. Miller, C. Wongsrichanalai, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 1658.

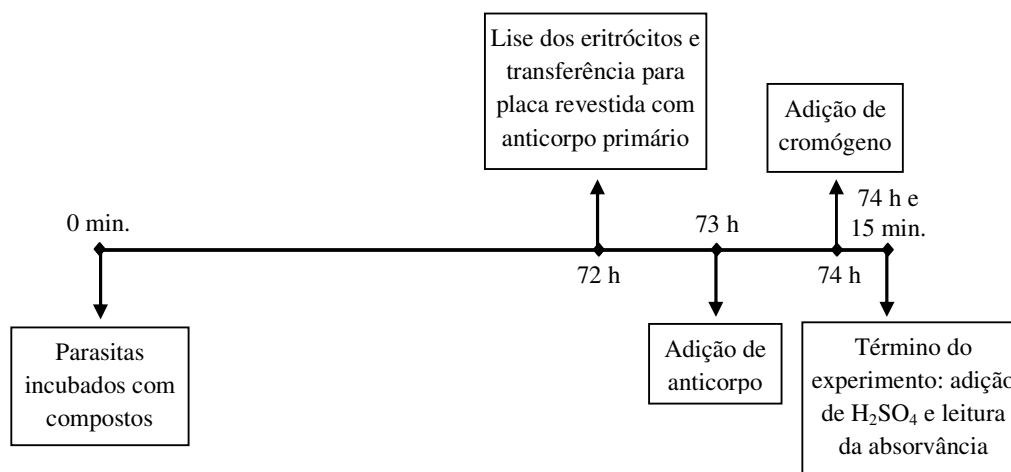


Figura 2.6. Avaliação da atividade antimalárica dos compostos frente culturas de *P. falciparum in vitro*.

2.3.4.3 Avaliação da citotoxicidade em células de hepatoma humano

A avaliação da citotoxicidade das hidrazonas e seus complexos de gálio(III) foi realizada em células de hepatoma humano HepG2, as quais encontravam-se conservadas em meio de cultura e congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As células foram crescidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado pelo calor e 40 mg de gentamicina em uma atmosfera de 5 % de CO_2 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células foram tripsinizadas, lavadas com meio de cultura, distribuídas em uma placa de 96 poços e, então, incubadas por 18 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A viabilidade celular foi medida através do ensaio com MTT.¹⁵ Alíquotas de 180 μL de suspensão celular em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 40 mg de gentamicina foram incubadas em placas de 96 poços, juntamente com 20 μL dos compostos testados em diferentes concentrações ($1,0 - 1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas em atmosfera de 5 % de CO_2 em ar e temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, 20 μL de solução de MTT $5\ \text{mg mL}^{-1}$ foram adicionados às células, as quais foram incubadas por mais 3 horas. Após este período de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido dos poços e 100 μL de DMSO foram adicionados, com homogeneização da mistura. A densidade ótica foi determinada em um leitor ELISA a 570 e 630 nm (Figura 2.7).

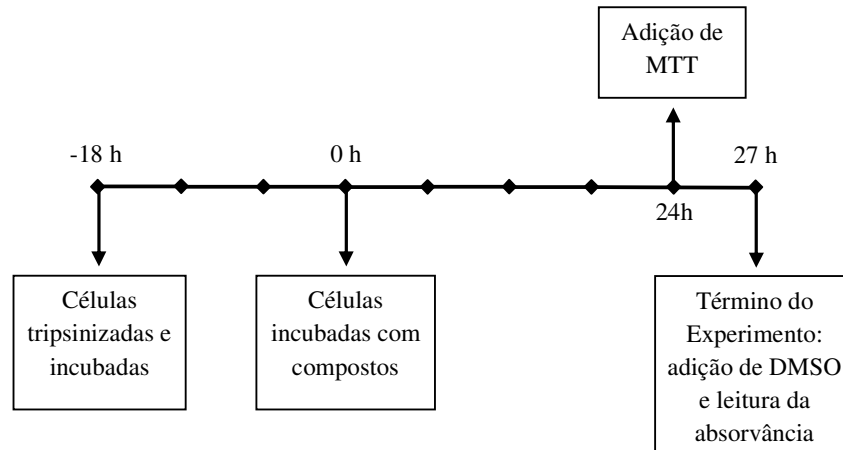


Figura 2.7. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em células de hepatoma humano.

2.3.5 Atividade antiangiogênica

A avaliação da atividade antiangiogênica do lapachol e seus complexos de gálio(III) e bismuto(III) foi realizada no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade.

2.3.5.1 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados com camundongos Swiss machos com sete a oito semanas de idade (20 a 30 g). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com comida e água fornecidas *ad libitum*. Esforços foram realizados para evitar desconforto desnecessário aos animais, os quais foram manipulados conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB.

2.3.5.2 Preparação dos discos de esponja e implante

Esponjas de poliéster/poliuretano (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) foram utilizadas como material implantado. Os implantes consistiram de discos de 5 mm de espessura x 8 mm de diâmetro. Os discos foram embebidos durante a noite em etanol 70 % v/v e esterilizados por fervura em água destilada por 15 minutos antes da implantação. Para a implantação dos discos, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (1 mg Kg⁻¹, i.p.), a região dorsal tricotomizada e a assepsia da pele feita com etanol 70 %. Uma incisão com cerca de 1 cm de

comprimento foi realizada na região dorso-lombar e os discos de esponja foram assepticamente implantados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais.

Após a implantação dos discos de esponja, os camundongos foram monitorados para verificar possíveis sinais de infecção no local da incisão, ou qualquer desconforto do animal. Uma vez que tais sinais sejam observados, os animais são imediatamente sacrificados conforme determinação do Comitê de Ética.

2.3.5.3 Administração intraperitoneal (i.p.) e per os dos compostos

Suspensões de lapachol, seus complexos de gálio(III) e bismuto(III), $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e BiCl_3 foram preparadas em tween 80,6 % em salina para administração i.p. ou em carboximetilcelulose (CMC) 0,5 % em salina para administração *per os*.

Os experimentos iniciaram no dia da implantação dos discos. Os animais tratados receberam suspensão dos compostos diariamente, a partir do segundo dia até o nono, enquanto os grupos controle receberam solução salina diariamente. Nove dias após a implantação, os animais foram sacrificados e os discos foram cuidadosamente removidos (Figura 2.8). O tratamento foi tolerado pelos animais durante o período experimental.

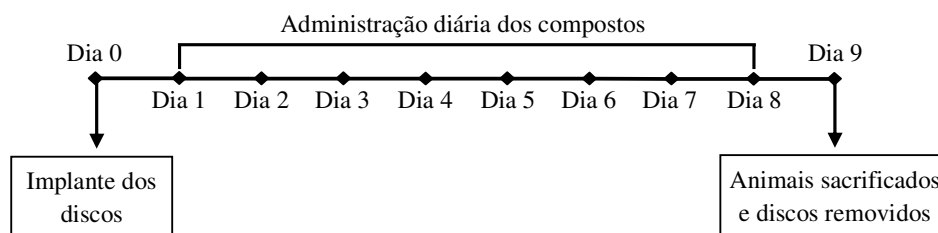


Figura 2.8. Administração dos compostos na avaliação de suas atividades antiangiogênicas.

2.3.5.4 Extração do tecido e determinação das atividades de mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase

O número de neutrófilos nos implantes foi determinado pelo ensaio da atividade de mieloperoxidase (MPO) conforme previamente descrito.^{20,21}

Após a excisão dos implantes, os discos foram pesados, homogeneizados em tampão pH 4,7 (0,1 mol L⁻¹ de NaCl, 0,02 mol L⁻¹ de Na₃PO₄, 0,015 mol L⁻¹ de NaEDTA) e centrifugados a 12,000 x g por 10 minutos. O sedimento foi re-suspendido em tampão Na₃PO₄ 0,05 mol L⁻¹ (pH

²⁰ M.A. Ferreira, L.S. Barcelos, P.P. Campos, A.C. Vasconcelos, M.M. Teixeira, S.P. Andrade, Br. J. Pharmacol. 141 (2004) 1185.

²¹ J.B. Mendes, P.P. Campos, M.A. Rocha, S.P. Andrade, Life Sci. 84 (2009) 537.

5,4) contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio e submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento usando nitrogênio líquido. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de MPO, ao qual foi adicionado tetrametilbenzidina ($1,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e H₂O₂ ($0,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). Estes reagentes foram incubados por 1 minuto, à temperatura ambiente. Após este período, 50 µL H₂SO₄ 4,0 mol L⁻¹ foi adicionado para interromper a reação.

A atividade de MPO foi determinada pela medida da absorvância em 450 nm e os resultados foram expressos como densidade óptica/grama de tecido úmido.

A infiltração de células mononucleares nos implantes foi quantificada pela dosagem da enzima lisossômica *N*-acetilglicosaminidase (NAG), a qual encontra-se presente em grande quantidade em macrófagos ativados.^{20,21}

Os implantes removidos após o nono dia de experimento foram homogeneizados em solução de NaCl 0,9 % v/v, contendo Triton X-100 0,1 % v/v. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 3000 g por 10 minutos a 4 °C. Amostras do sobrenadante foram incubadas por 10 minutos com *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-D-glicosamina preparada em tampão citrato/fosfato pH 4,5 (ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹, Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹) para gerar uma concentração final de $2,24 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 mol L⁻¹ (pH 10,6).

A hidrólise do substrato foi determinada pela medida da absorvância em 400 nm e os resultados foram expressos em nmol mg⁻¹ de tecido úmido.

2.3.5.5 Extração de hemoglobina

A extensão da vascularização dos implantes de esponja foi determinada pela quantidade de hemoglobina detectada no tecido, segundo o método descrito por Drabkin²² e adaptado por Plunkett²³ como índice de neovascularização.

Após excisão cuidadosa dos implantes, cada um foi pesado e, posteriormente, homogeneizado em 5 mL de reagente de Drabkin (Tekmar TR-10, OH). O homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 12000 g e o sobrenadante obtido foi filtrado em filtro de 0,22 µm (Millipore).

A concentração de hemoglobina foi determinada através de leituras espectrofotométricas em leitor de ELISA a 540 nm e comparação destas leituras com uma curva

²² D.L. Drabkin, J.H. Austin, J. Biol. Chem. 98 (1932) 719.

²³ M.L. Plunkett, J.A. Hailey, Lab. Invest. 62 (1990) 510.

padrão previamente estabelecida. A quantidade de hemoglobina nos implantes foi expressa em μg de hemoglobina/mg de tecido úmido.

2.3.5.6 *Análise histológica*

A avaliação histológica foi realizada para os grupos tratados e controle, após a excisão dos implantes. Os tecidos coletados foram fixados em solução de formalina (10 % em salina isotônica). Sessões de 5 μm foram cortadas, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e processadas para estudos microscópicos de luz.

2.3.5.7 *Análise estatística*

Os resultados experimentais são apresentados como valor medido \pm SEM. As diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controle foram avaliadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo fator de correção Newman-Keuls. As diferenças entre as medidas foram consideradas significativas quando os valores de *P* foram inferiores a 0,05.

2.3.6 *Atividade antichagásica*

A atividade antichagásica das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) foi determinada pelo Grupo de Química Medicinal da Facultad de Química da Universidad de La República, Montevideo. Este estudo foi realizado por meio de parceria com o Prof. Dr. Hugo Cerecetto. Por sua vez, a determinação da citotoxicidade dos compostos foi realizada em colaboração com a Dr^a. Valéria Rêgo Alves Pereira do Laboratório de Imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, PE.

2.3.6.1 *Avaliação da atividade antichagásica*

A atividade antichagásica dos compostos foi avaliada frente à forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* Tulahuen 2, a qual foi crescida a 28 °C em meio anóxico, suplementado com 5 % de soro fetal bovino, conforme previamente descrito.^{24,25} As células foram colhidas na sua fase de crescimento exponencial, re-suspendidas no meio, contadas em câmara de Neubauer e adicionadas em placas de 24 poços (2,0 x 10⁶ células mL⁻¹). O crescimento celular foi medido como absorvância da cultura a 590 nm, a qual é proporcional ao número de células presentes.

²⁴ G. Alvarez, B. Aguirre-López, J. Varela, M. Cabrera, R. Pérez-Montfort, M.T. De Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5767.

²⁵ A Gerpe, L. Boiani, P. Hernández, M. Sortino, S. Zacchino, M. González, H. Cerecetto, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2154.

Antes da inoculação, o meio foi suplementado com diferentes concentrações dos compostos estudados, os quais foram previamente dissolvidos em DMSO. A concentração de DMSO no meio de cultura não excedeu 0,4 % e o controle foi preparado na presença de 0,4 % de DMSO. A porcentagem de inibição de crescimento (PIC) foi calculada como: $PIC = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, onde $A_p = A_{600}$ da cultura contendo os compostos estudados no quinto dia (controle); $A_{0p} = A_{600}$ da cultura contendo os compostos estudados logo após a adição do inóculo (dia 0); $A_c = A_{600}$ da cultura na ausência de composto no quinto dia; $A_{0c} = A_{600}$ na ausência do composto (dia 0). O valor de IC_{50} dos compostos foi determinado como a concentração capaz de reduzir o crescimento do parasita em 50 %, comparado ao controle.

Nifurtimox foi utilizado como fármaco tripanomicida de referência e $SbCl_3$ foi incluído nos ensaios para verificar a atividade anti-*Trypanosoma* do antimônio(III) *per se*.

2.3.6.2 Avaliação da atividade citotóxica

A citotoxicidade dos compostos foi determinada utilizando-se esplenócitos de camundongos BALB/c tratados em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina em placas de 96 poços ($6,0 \times 10^5$ células/poço). Cada composto foi avaliado nas concentrações 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As culturas foram incubadas na presença de ^3H -timidina ($1,0 \mu\text{Ci/poço}$) por 24 horas a 37°C e atmosfera com 5 % de CO_2 . Após este período, o conteúdo da placa foi recolhido para determinar a incorporação de ^3H -timidina.

A porcentagem de incorporação de ^3H -timidina foi utilizada como um indicador da viabilidade celular e a citotoxicidade foi determinada comparando-se a porcentagem de incorporação das células tratadas com as células controle. As concentrações foram consideradas não-tóxicas quando a redução na incorporação de ^3H -timidina foi inferior a 30 %.

Os estudos foram realizados em triplicata, em dois ensaios diferentes.

2.3.7 Atividade leishmanicida

Os estudos para a determinação da atividade leishmanicida dos compostos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade da UFAL, em parceria com a Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira.

2.3.7.1 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados utilizando-se camundongos machos da linhagem Swiss com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFAL e mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 horas). Os camundongos foram manipulados de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (número de protocolo: 23065.024392/2009-90). Após o término do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

2.3.7.2 Cultura de *Leishmania major*

A cepa IOC/L0581 (MHOM/SU/1973/5-ASKH) de *Leishmania major* foi utilizada em todos os experimentos. Os parasitas foram cultivados *in vitro* como formas promastigotas em placas de 48 poços com meio Schneider suplementado com 2,0 mmol L⁻¹ de L-glutamina, 10 % de soro fetal bovino e 2 % de urina humana.

2.3.7.3 Avaliação da atividade leishmanicida

Diferentes concentrações dos compostos estudados foram adicionadas aos poços contendo as formas promastigotas de *L. major*. A placa foi incubada por 48 horas em estufa BOD a 27 °C. Após este período, as promastigotas foram homogeneizadas e o número de parasitas foi determinado em contador automático de células.²⁶

2.3.7.4 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos inflamatórios foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos normais, quatro dias após a injeção de 1 mL de meio tioglicolato de sódio a 4 % estéril.²⁷ Após este período, o peritônio foi lavado com 5 mL de solução de Hank. As células foram contadas, ajustadas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino na densidade de $2,0 \times 10^7$ células mL⁻¹ e 200 µL da suspensão foi distribuída em placa de 96 poços. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7 % de CO₂ para adesão dos macrófagos à placa. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e diferentes concentrações dos compostos previamente dissolvidos em DMSO foram

²⁶ J.L. Ávila, A. Ávila, M.A. Polegre, V.E. Márquez, Am. J. Trop. Med. Hyg. 57 (1997) 407.

²⁷ F.L. Ribeiro-Gomes, M.C. Moniz-de-Souza, M.S. Alexandre-Moreira, W.B. Dias, M.F. Lopes, M.P. Nunes, G. Lungarella, G.A. Dos Reis, J. Immunol. 179 (2007) 3988.

adicionadas. Os macrófagos foram cultivados com DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino na ausência (controle) ou presença dos compostos e mantidos a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7 % de CO₂ por 48 horas. A Figura 2.9 apresenta um esquema da parte experimental.

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de dosagem de lactato desidrogenase (LDH),²⁸ comparando-se as culturas tratadas com as culturas controle.

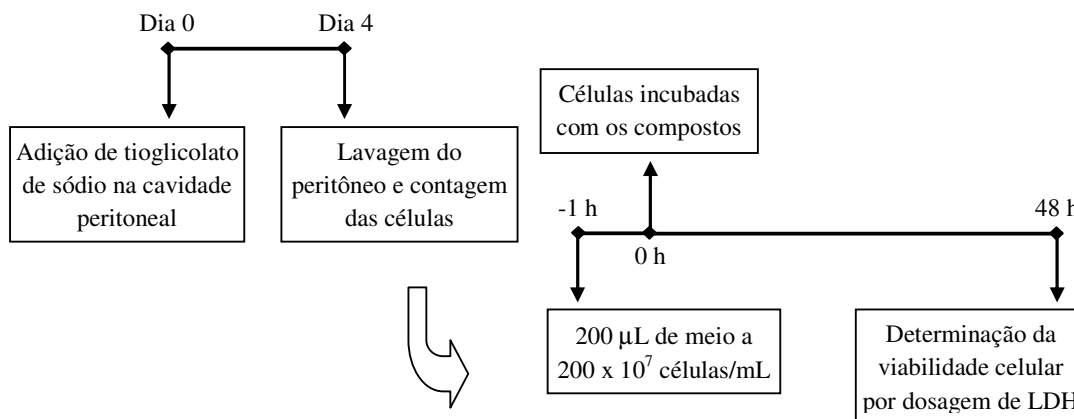


Figura 2.9. Determinação da viabilidade celular em macrófagos.

2.3.7.5 Análise estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e controle foram determinados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad®Prisma 3.1. Os valores foram considerados significativos quando * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ para os grupos comparados com o veículo ou quando # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ para os grupos comparados com o controle negativo.

2.4 Estudos Teóricos

Todos os estudos teóricos foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Willian R. Rocha do Departamento de Química da UFMG.

²⁸ C.L. Koski, L.E. Ramm, C.H. Hammer, M.M. Mayer, M.L. Shin, PNAS 80 (1983) 3816.

2.4.1 Avaliação da relação estrutura-atividade – Hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina: atividade citotóxica

Com o intuito de verificar a existência de alguma relação estrutura-atividade, estudos SAR foram realizados para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.

As análises conformacionais das hidrazonas foram realizadas em fase gasosa pelo método MMFF²⁹ implementado no programa de modelagem molecular Tinker³⁰. Em todos os casos, os isômeros *E* e *Z* foram analisados. As estruturas obtidas na análise conformacional foram otimizadas pelo método DFT³¹, empregando a função híbrida B3LYP^{32,33} e usando o conjunto de bases de elétrons 6-31G(d)^{34,35} em todos os átomos. Com o intuito de obter melhores propriedades e resultados de energia, cálculos de energia no ponto simples ao nível da teoria de perturbação de segunda ordem de Møller-Plesset^{36,37} foram realizados nas estruturas otimizadas B3LYP/6-31G(d), utilizando o mesmo conjunto de bases (MP2/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)). A distribuição de carga nos confôrmeros mais estáveis foi computada empregando o formalismo NBO.^{38,39} Todos os cálculos de mecânica quântica foram realizados no programa Gaussian.⁴⁰ As energias de HOMO e LUMO e o momento dipolo foram obtidos após a otimização das estruturas e utilizados como descritores para estudos SAR. As estruturas tridimensionais obtidas das otimizações foram utilizadas como entrada para o software Marvin⁴¹, onde foi calculada a área da superfície molecular. O coeficiente de partição (LogP) teórico foi determinado no programa

²⁹ M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 3902.

³⁰ TINKER Software Tools for Molecular Design, 5.0, 2009: TINKER Software Tools for Molecular Design, 5.0; Jay W. Ponder Lab, Dept. of Biochemistry & Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine: St. Louis, 2009.

³¹ R.G. Parr, W. Yang, Density-Functional Theory of Atoms and Molecule, Oxford University Press, Oxford, 1989.

³² A.D. Becke, J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648.

³³ C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785.

³⁴ R. Ditchfield, W.J. Hehre, J.A. Pople, J. Chem. Phys. 54 (1971) 724.

³⁵ W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, J. Chem. Phys. 56 (1972) 2257.

³⁶ C. Møller, M.S. Plesset, Phys. Rev. 46 (1934) 618-622.

³⁷ A. Szabo, N.S. Ostlund, Modern quantum chemistry. Introduction to advanced electronic structure theory, Dover Publication, Inc. New York, 1996.

³⁸ A.E. Reed, F. Weinhold, J. Chem. Phys. 78 (1983) 4066.

³⁹ A.E. Reed, R.B. Weinstock, F. Weinhold, J. Chem. Phys. 83 (1985) 735.

⁴⁰ Gaussian 03, Revision C.02, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

⁴¹ ChemAxon program, Budapest, Hungary. Available: www.chemaxon.com/products.html (Accessed: April 2011).

ALOGPS 2.1.⁴² A área de superfície molecular e o LogP também foram usados como descritores nos estudos de SAR.

2.4.2 Avaliação da relação estrutura-atividade – Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de Sb(III) e Sn(IV): atividades anti-Leishmania, anti-Trypanosoma e antifúngica

Cálculos teóricos foram realizados para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e para seus complexos de antimônio(III) e estanho(IV) com o intuito de determinar relações entre as estruturas dos compostos e suas atividades farmacológicas.

As otimizações de geometria dos compostos e os cálculos de frequência foram realizados pelo método DFT³¹, utilizando o híbrido de troca de Becke de três parâmetros (B3)³², juntamente com a função de correlação sugerida por Lee, LYP³³. O conjunto de bases 6-31G(d) foi usado para todos os átomos dos ligantes. Os átomos de antimônio e estanho foram tratados pelo potencial de núcleo efetivo SBKJC associado com um conjunto de bases polarizadas 2d.^{43,44} Todos os cálculos foram realizados com o programa GAMESS.⁴⁵

⁴² ALOGPS 2.1 Program. Available: <http://www.vcclab.org/lab/alogps> (Accessed: April 2011).

⁴³ N.P. Labello, A.M. Ferreira, H.A. Kurtz, J. Comput. Chem. 26 (2005) 1464.

⁴⁴ N.P. Labello, A.M. Ferreira, H.A. Kurtz, Int. J. Quantum Chem. 106 (2006) 3140.

⁴⁵ M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, M. Dupuis, J.A. Montgomery, J. Comput. Chem. 14 (1993) 1347.

Capítulo 3. Complexos de zinco(II) de hidrazonas derivadas de salicilaldeído: avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva

Inflamação é uma resposta do sistema imune a danos físicos, químicos ou biológicos, entendendo-se por dano qualquer processo capaz de causar lesões em células ou tecidos. A inflamação aguda possui um papel fisiológico em circunstâncias normais, enquanto a inflamação crônica exerce efeitos prejudiciais na função de células e tecidos. Desta forma, processos inflamatórios participam de um grande número de doenças como aterosclerose, mal de Alzheimer, doença de Parkinson, artrite reumatóide, dentre outras.^{1,2}

O zinco é um elemento traço essencial para manutenção da função e estrutura de uma grande quantidade de macromoléculas e para uma variedade de reações enzimáticas, as quais mediam uma ampla faixa de processos fisiológicos. Estes processos incluem a produção de colágeno, de células imunorregulatórias e células inflamatórias. Assim, o zinco pode ser considerado um importante agente imunorregulatório com atividades anti-inflamatórias.³

O potencial farmacológico de compostos de zinco vem sendo estudado ao longo do tempo e algumas formulações que apresentam este metal são utilizadas na clínica. Um exemplo de fármaco contendo zinco é o Dermodex[®] (nistidina mais óxido de zinco), o qual é empregado no tratamento de dermatites.⁴ Sais de zinco(II) também estão sendo utilizados no tratamento de doenças metabólicas graves.⁵ Além disso, estudos recentes apresentam complexos de zinco(II) com potenciais atividades biológicas, dentre elas, atividade anti-inflamatória.⁶

Por sua vez, as hidrazonas são uma classe de compostos que apresentam muitas atividades farmacológicas.⁷ Estudos revelam que acil-hidrazonas apresentam atividades analgésica^{8,9}, vasodilatadora¹⁰ e anti-inflamatória⁹.

¹ D.J. Kominsky, E.L. Campbell, S.P. Colgan, J. Immunol. 184 (2010) 4062.

² V.W. Yong, Neuroscientist 16 (2010) 408.

³ P.D. Zalewski, A.Q. Truong-Tran, D. Grosser, L. Jayaram, C. Murgia, R.E. Ruffin, Pharmacol. Ther. 105 (2005) 127.

⁴ A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad, As bases farmacológicas da terapêutica. 7. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1987.

⁵ M.L. Schilsky, Biochimie 91 (2009) 1278.

⁶ C.T. Dillon, T.W. Hambley, B.J. Kennedy, P.A. Lay, Q. Zhou, N.M. Davies, J.R. Biffin, H.L. Regtop, Chem. Res. Toxicol. 16 (2003) 28.

⁷ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 2117.

⁸ H.J.C. Bezerra-Neto, D.J. Lacerda, A.L.P. Miranda, H.M. Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Bioorg. Med. Chem. 14 (2006) 7924.

⁹ Y.K.C. Da Silva, C.V. Augusto, M.L.C. Barbosa, G.M.A. Melo, A.C. De Queiroz, T.L.M.F. Dias, W. Bispo Júnior, E.J. Barreiro, L.M. Lima, M.S. Alexandre-Moreira, Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 5007.

¹⁰ A.E. Kümmerle, J.M. Raimundo, C.M. Leal, G.S. Da Silva, T.L. Balliano, M.A. Pereira, C.A. De Simone, R.T. Sudo, G. Zapata-Sudo, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 4004.

Neste capítulo são relatadas a caracterização de complexos de zinco(II) com hidrazonas derivadas de salicilaldeído, bem como uma avaliação farmacológica dos compostos em modelos animais de nocicepção aguda e periférica e inflamação aguda. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados nas revistas *Molecules*¹¹ e *Polyhedron*¹² (ver Anexo).

3.1 Caracterização dos complexos de zinco(II) de hidrazonas derivadas de salicilaldeído

Os complexos de zinco(II) [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (**1**), [Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂ (**2**) e [Zn(LASSBio-1064)]₂ (**3**) (Figura 3.1) foram obtidos a partir de salicilaldeído 2-clorobenzoil hidrazona (H₂LASSBio-466) e salicilaldeído 4-clorobenzoil hidrazona (H₂LASSBio-1064), conforme descrito na seção 2.2.1.

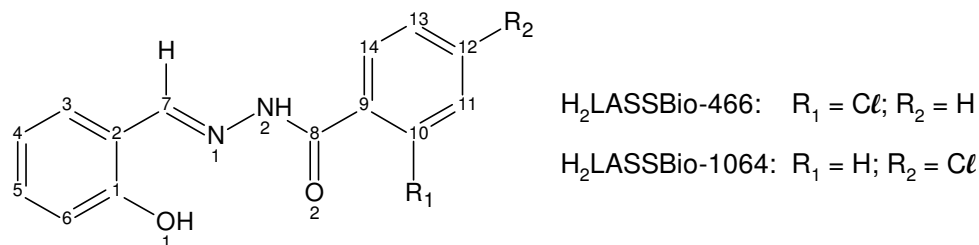


Figura 3.1. Estrutura das hidrazonas derivadas de salicilaldeído e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

3.1.1 Análises

Os rendimentos, pontos de fusão, massas molares, microanálises e condutividades molares dos compostos são apresentados na Tabela 3.1. As propostas estruturais dos complexos (**1-3**) encontram-se na Figura 3.2.

Os dados de análise elementar e condutividade molar¹³ dos complexos indicam a formação de [Zn(LASSBio-466)H₂O]_n, [Zn(HLASSBio-1064)Cl]_n e [Zn(LASSBio-1064)]_n. No primeiro composto, uma hidrazona dianiônica coordena-se ao centro metálico após desprotonação em N(2)-H e O(1)H. O sítio de coordenação remanescente é ocupado por uma molécula de água, conforme indicado pelo espectro de infravermelho do composto (seção 3.1.3). No segundo composto, uma hidrazona monoaniônica é coordenada ao zinco após desprotonação de O(1)-H, juntamente com um íon cloreto. Após recristalização de [Zn(HLASSBio-1064)Cl]_n em DMSO:acetona 1:9, cristais do composto

¹¹ W. Bispo Júnior, M.S. Alexandre-Moreira, M.A. Alves, A. Perez-Rebolledo, G.L. Parrilha, E.E. Castellano, O.E. Piro, E.J. Barreiro, L.M. Lima, H. Beraldo, *Molecules* 16 (2011) 6902.

¹² G.L. Parrilha, R.P. Vieira, A.P. Rebolledo, I.C. Mendes, L.M. Lima, E.J. Barreiro, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 1891.

¹³ W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.

$[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{H}_2\text{O})]_2 \cdot [\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$ foram obtidos (ver seção 3.1.4). Este composto consiste de dois complexos de zinco binucleares ligados por pontes fenoxo. Embora a estrutura cristalográfica obtida não represente o complexo presente no pó, verifica-se a capacidade da hidrazona $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ em formar dímeros. Por sua vez, o terceiro composto apresenta o zinco(II) coordenado a uma hidrazona dianiônica, a qual encontra-se desprotonada tanto em N(2)-H quanto no grupo fenol. Visto que $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ possui apenas três sítios de coordenação e que um complexo de zinco(II) com número de coordenação três é muito improvável, propõe-se a presença do dímero $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$, corroborando a capacidade de $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ em formar estruturas diméricas. Assim, o composto $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_n$ provavelmente também existe como o dímero $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$.

Considerando que as hidrazonas $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ e $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ são muito similares, apresentando os mesmos sítios de coordenação e que a dimerização é favorecida por esta classe de compostos¹², é razoável supor que o complexo obtido com $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ seja também um complexo binuclear. Desta forma, os complexos de zinco(II) obtidos com as hidrazonas derivadas de salicilaldeído são formulados como $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**), $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**) e $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$ (**3**) (Figura 3.2).

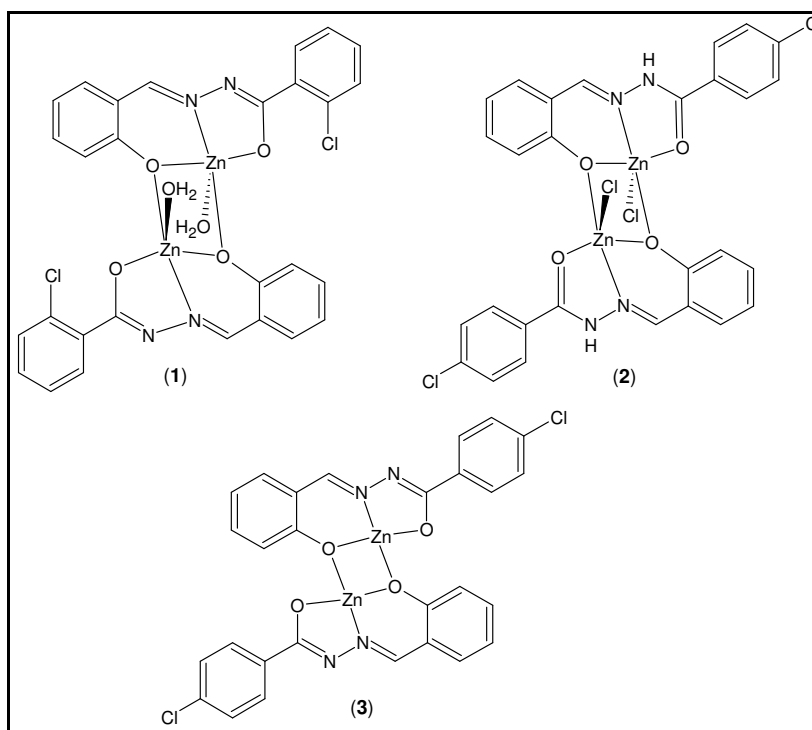


Figura 3.2. Estruturas propostas para os complexos $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**), $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**) e $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$ (**3**).

A determinação da temperatura de fusão dos complexos não foi possível devido ao limite de aquecimento do aparelho (300 °C). No entanto, pode-se concluir que os compostos não apresentam as hidrazonas de origem como impureza.

Tabela 3.1. Rendimento, ponto de fusão*, análise elemental** e massa molar dos complexos [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (**1**), [Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂ (**2**) e [Zn(LASSBio-1064)]₂ (**3**)

Composto	Rend. (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	MM (g mol ⁻¹)	Λ _M (cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹)
[Zn(LASSBio-1064)H ₂ O] ₂ (1)	68	> 300 (147,6-150,1)	47,22 (47,26)	3,11 (2,85)	7,87 (7,40)	712,18	8,23
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	71	> 300 (205,9-209,4)	44,89 (44,72)	2,69 (2,24)	7,48 (7,10)	749,11	11,35
[Zn(LASSBio-1064)] ₂ (3)	91	> 300 (205,9-209,4)	49,50 (49,74)	2,35 (2,68)	8,40 (8,29)	676,15	13,75

* Ponto de fusão das hidrazonas entre parênteses; **Valores teóricos entre parênteses

3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

Espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos complexos de zinco(II) e suas respectivas hidrazonas foram obtidos utilizando-se DMSO-*d*₆ como solvente. No entanto, a baixa solubilidade de **3** impossibilitou a obtenção do seu espectro de RMN de ¹³C. A Figura 3.3 apresenta os espectros de RMN de ¹H de H₂LASSBio-1064 e [Zn(LASSBio-1064)]₂ (**3**).

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de H₂LASSBio-466 apresentam sinais duplicados, indicando a presença de isômeros configuracionais *E* e *Z*. De fato, os sinais de N(2)-H observados em δ 11,05 e 9,84 ppm são atribuídos aos isômeros *Z* e *E*, respectivamente. No primeiro caso, N(2)-H apresenta uma ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo fenol, enquanto no segundo caso a ligação de hidrogênio ocorre com uma molécula de solvente.^{14,15,16,17} Por sua vez, apenas um sinal foi observado para cada hidrogênio e cada carbono nos espectros de H₂LASSBio-1064, os quais são compatíveis com a presença do isômero *E*.

¹⁴ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 3797.

¹⁵ A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

¹⁶ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 2117.

¹⁷ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, J. Mol. Struct. 920 (2009) 97.

Os espectros dos complexos apresentam apenas um sinal para cada hidrogênio e cada carbono. O sinal referente ao hidrogênio O(1)-H está ausente nos espectros de todos os complexos, sugerindo a desprotonação do grupo fenol. Além disso, o sinal referente ao hidrogênio N(2)-H também desaparece nos espectros de **1** e **3**, concordando com a presença de hidrazonas dianiônicas. Por sua vez, o sinal de N(2)-H é observado no espectro de RMN de ^1H do complexo (**2**), indicando a presença da hidrazona monoaniônica, conforme proposto anteriormente por análise elementar.

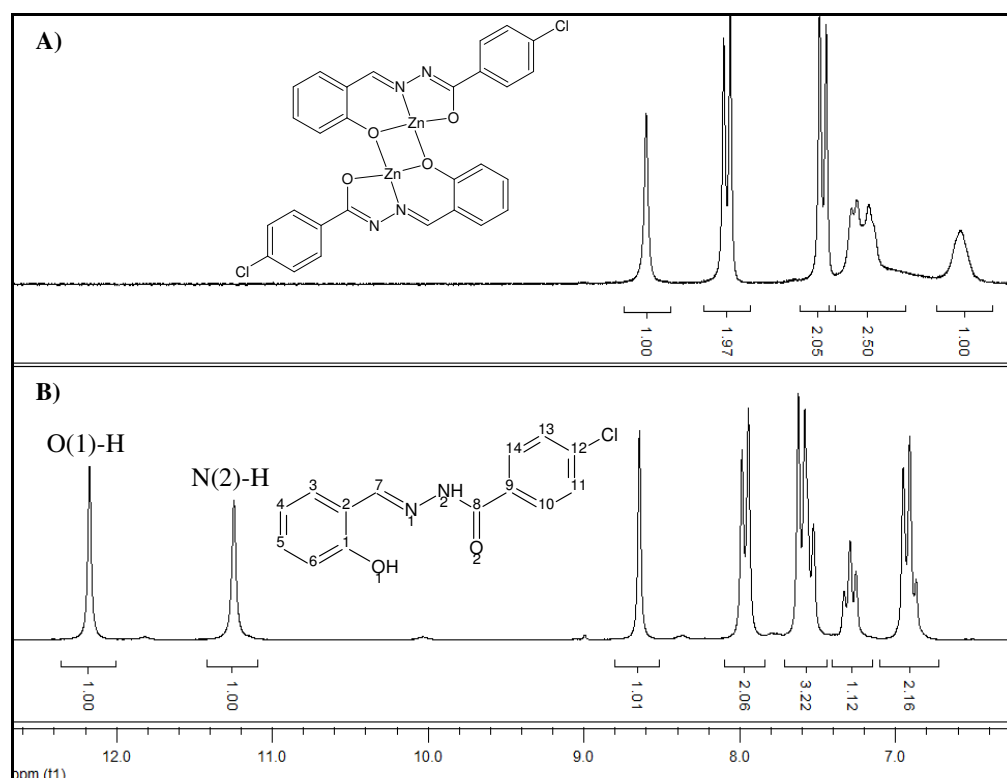


Figura 3.3. Espectros de RMN de ^1H A) do complexo $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})]_2$ (**3**) e B) da hidrazona livre $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$.

Os sinais de hidrogênio nos espectros de RMN de ^1H dos complexos sofrem significativas mudanças em relação à sua posição nas hidrazonas livres. Da mesma forma, os sinais dos carbonos $\text{C}(7)=\text{N}(1)$, $\text{C}(8)=\text{O}(2)$ e os carbonos do grupo fenol sofrem significativos deslocamentos nos complexos (**1**) e (**2**), sugerindo coordenação pelo sistema $\text{O}_{\text{fenol}}-\text{N}-\text{O}$. Embora o espectro de RMN de ^{13}C de **3** não tenha sido obtido, devido à sua baixa solubilidade, as mudanças de todos os sinais de hidrogênio após a coordenação e a ausência dos sinais N(2)-H e O(1)-H também sugerem a coordenação através do sistema quelante $\text{O}_{\text{fenol}}-\text{N}-\text{O}$. Então, as hidrazonas adotam a configuração *E* nos complexos (**1-3**).

As atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C das hidrazonas e seus complexos de zinco(II) são apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3. A numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes encontra-se na Figura 3.1.

Tabela 3.2. Atribuição, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^1H das hidrazonas $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ e $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ e dos seus respectivos complexos de zinco(II)

Atribuição	Número de H	$\text{H}_2\text{LASSBio-466}$		1	$\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$		2	3
		Z	E		Isômero E			
O(1)-H	1	12,15	12,07	---	12,18	---	---	---
N(2)-H	1	11,05	9,84	---	11,23	11,81	---	---
H3	1	7,45	7,49	7,44-7,47	7,55	7,38	7,28	7,28
H4	1	6,88-7,00	6,75-6,82	6,70	6,88-6,95	6,89	6,59	6,59
H5	1	7,28-7,35	7,16-7,24	7,51	7,31	7,24	7,15-7,25	7,15-7,25
H6	1	6,88-7,00	6,75-6,82	6,79	6,88-6,95	6,73	7,15-7,25	7,15-7,25
H7	1	8,50	8,29	7,54	8,63	8,99	8,61	8,61

Tabela 3.3. Atribuição e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das hidrazonas $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ e $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ e dos seus respectivos complexos de zinco(II)

Atribuição	DEPT	$\text{H}_2\text{LASSBio-466}$		1	$\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$		2
		Z	E		Isômero E		
C1	--	157,35	156,49	158,02	157,56	166,81	166,81
C2	--	118,86	118,60	119,69	118,75	118,75	118,75
C3	↑	127,23	127,16	127,48	129,58	129,58	129,58
C4	↑	119,35	119,37	119,35	119,53	119,53	119,53
C5	↑	131,57	131,14	131,38	131,62	131,62	131,62
C6	↑	116,37	116,10	118,37	116,54	116,54	116,54
C(7)=N	↑	148,17	144,07	150,59	148,67	155,61	155,61
C(8)=O	--	168,13	162,21	169,73	162,01	168,88	168,88

3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho

Espectros de infravermelho foram obtidos para as hidrazonas livres e seus complexos de zinco(II) na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As principais bandas para o entendimento do modo de coordenação do ligante são apresentadas na Tabela 3.4.

As absorções atribuídas ao estiramento $\nu(\text{O-H})$ em 3450 e 3436 cm^{-1} nos espectros de infravermelho das hidrazonas não estão presentes nos espectros dos complexos, concordando

com a desprotonação do grupo fenol. As bandas referentes à absorção do grupo $\nu(\text{C}=\text{O})$ também desaparecem nos espectros dos complexos **(1)** e **(3)**, indicando a coordenação através do oxigênio enolato.^{14,15} Este tipo de coordenação é decorrente da desprotonação de N(2)-H e formação de um sistema altamente deslocalizado. Por outro lado, a banda referente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ em 1646 cm^{-1} no espectro de $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ muda para 1616 cm^{-1} no espectro de **2**, sugerindo coordenação através do oxigênio de carbonila.^{14,16,17}

As absorções atribuídas ao modo $\nu(\text{C}=\text{N})$ das hidrazonas livres deslocam-se de 1625 e 1624 cm^{-1} para $1614\text{-}1601\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, indicando a coordenação pelo nitrogênio azometínico.¹⁴⁻¹⁷

Uma nova absorção em 1604 no espectro de infravermelho do complexo **(1)** foi atribuída à vibração $\nu(\text{OH}_2)$, confirmando a presença de água de coordenação.¹⁸

Desta forma, a espectroscopia de infravermelho apóia a proposta de coordenação das hidrazonas ao zinco(II) pelo sistema $\text{O}_{\text{fenol}}\text{-N-O}$.

Tabela 3.4. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ e $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ e dos seus respectivos complexos de zinco(II)

Composto	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$
$\text{H}_2\text{LASSBio-466}$	3450	3215	1657	1625
$[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]$ (1)	---	---	---	1614
$\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$	3436	3371	1642	1624
$[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]$ (2)	---	3179	1618	1611
$[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})_2]$ (3)	---	---	---	1601

3.1.4 Cristalografia de Raios X

Cristais da hidrazona $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$ foram obtidos a partir de uma solução DMSO:acetona 1:9, os quais foram adequados para a obtenção da estrutura cristalográfica do composto (Figura 3.4). Além disso, após a recristalização do complexo $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ **(2)** em DMSO:acetona 1:9, cristais de $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{H}_2\text{O})]_2 \cdot [\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$ **(2a)** também foram obtidos. A estrutura determinada para **2a** é apresentada na Figura 3.5.

Os dados cristalográficos dos compostos foram coletados no difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD, a temperatura ambiente. Os resumos da coleção de dados e do refinamento das estruturas^{19,20,21,22,23,24} estão dispostos na Tabela 3.5.

¹⁸ K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. 4th ed. New York: Wiley, 1986.

Tabela 3.5. Resumo da coleção de dados e de refinamento da hidrazona H₂LASSBio-466 e do complexo [Zn(LASSBio-1064)(H₂O)]₂·[Zn(LASSBio-1064)(DMSO)₂]₂ (**2a**)

Composto	H ₂ LASSBio-466	(2a)	
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	C ₆₄ H ₆₂ Cl ₄ N ₈ O ₁₄ S ₄ Zn ₄	
Massa molecular	274,70	1700,75	
Temperatura, K	294(2)	294(2)	
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	
Grupo espacial	P2 ₁ /c	Pī	
Dimensões da célula unitária	a, Å	9,889(1)	8,914(1)
	b, Å	13,360(2)	14,808(1)
	c, Å	10,079(1)	15,598(1)
	α, °	90	61,933(4)
	β, °	93,10(1)	77,560(4)
	γ, °	90	80,875(5)
Volume, Å ³	1329,7(3)	1770,2(3)	
Z, Densidade calc., Mg/m ³	4; 1,372	1; 1,595	
μ, mm ⁻¹	0,286	1,676	
F(000)	568	868	
Tamanho do cristal, mm	0,20 × 0,12 × 0,08	0,12 x 0,14 x 0,22	
Intervalo de θ (°)	3,05 a 24,08	3,42 a 26,00	
	-10 ≤ h ≤ 11	-10 ≤ h ≤ 11	
Intervalo de hkl	-15 ≤ k ≤ 15	-18 ≤ k ≤ 18	
	-11 ≤ l ≤ 11	-19 ≤ l ≤ 19	
Qualidade de ajuste, S	1,016	1,092	
Reflexões medidas/únicas (R _{int})	5646/2095 (0,032)	12607/6595 (0,083)	
Reflexões observadas [I>2σ(I)]	1612	5209	
Parâmetros ref. / restrições	184 / 0	448 / 0	
R [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0474; wR ₂ = 0,1296	R ₁ = 0,0845; wR ₂ = 0,2328	
R (all)	R ₁ = 0,0637; wR ₂ = 0,1479	R ₁ = 0,1030; wR ₂ = 0,2536	
Coeficiente de extinção	0,07(1)	0,055(7)	
Δρ min. / max., eÅ ⁻³	0,180 / -0,246	2,588 / -1,433	

¹⁹ Enraf-Nonius. *COLLECT*; B.V. Nonius: Delft, The Netherlands, 1997-2000.

²⁰ CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK Scaling Algorithm.

²¹ G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.

²² G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.

²³ Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods in Enzymology*; C.W. Carter Jr., R.M. Sweet, Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1997; pp. 307-326.

²⁴ A.L. Spek, PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 1998.

A hidrazona H₂LASSBio-466 cristaliza-se em um sistema monoclinico (P2_{1/c}) com quatro moléculas por célula unitária (Z = 4). H₂LASSBio-466 apresenta-se na forma do isômero configuracional *E*, a qual é estabilizada pela ligação de hidrogênio intermolecular N(2)-H(2)···O(2'). Uma interação de hidrogênio intramolecular O(1)-H(1)···N(1) também é observada na estrutura da hidrazona.

Os anéis fenílicos apresentam um sistema deslocalizado, com distâncias C-C entre 1,359 e 1,400 Å para o anel do grupo fenol e entre 1,370 e 1,388 Å para o anel contendo o íon cloreto. Os comprimentos C(1)-O(1) e C(10)-Cl são 1,353(3) e 1,724(3) Å, respectivamente.

As distâncias de ligação dos grupos C(8)=O(2) e C(7)=N(1) são 1,226(2) e 1,272(3) Å, respectivamente. Estas distâncias são similares a distâncias observadas para outras hidrazonas.¹⁵ O comprimento de ligação N(1)-N(2) é de 1,376(3) Å, concordando com os valores obtidos para ligações simples deste tipo.^{15,25,26}

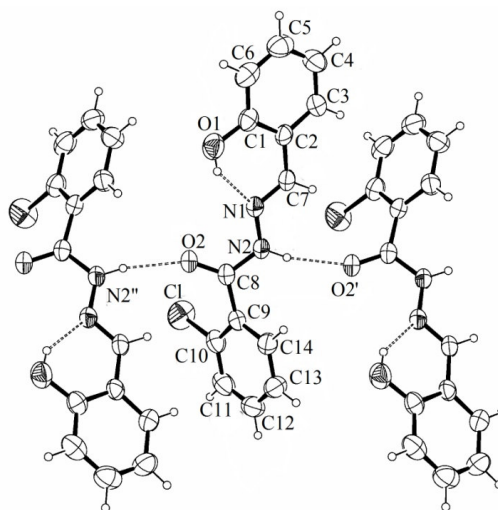


Figura 3.4. Diagrama ORTEP de salicilaldeído 2-clorobenzoil hidrazona (H₂LASSBio-466).

²⁵ J. Valdés-Martínez, R.A. Toscano, R. Salcedo, R. Cea-Olivares, A. Meléndez, *Monatsh. Chem.* 121 (1990) 641.

²⁶ J.-L. Lu, S.-T. Min, X.-H. Ji, Z.-H. Dang, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* 64 (2008) O1694.

Tabela 3.6. Comprimento de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados de salicilaldeído 2-clorobenzoil hidrazona (H₂LASSBio-466)

Átomos	Comprimento de ligação	Átomos	Ângulos de ligação
O(1)-C(1)	1,724(3)	O(1)-C(1)-C(2)	122,4(2)
C(2)-C(7)	1,445(3)	C(2)-C(7)-N(1)	121,1(2)
C(7)-N(1)	1,272(3)	C(7)-N(1)-N(2)	117,2(2)
N(1)-N(2)	1,376(3)	N(1)-N(2)-C(8)	118,6(2)
N(2)-C(8)	1,346(3)	N(2)-C(8)-O(2)	122,1(2)
C(8)-O(2)	1,226(3)	N(2)-C(8)-C(9)	114,7(2)
C(8)-C(9)	1,494(3)	O(2)-C(8)-C(9)	123,2(2)
C(10)-Cl	1,353(3)		

O composto [Zn(LASSBio-1064)(H₂O)]₂·[Zn(LASSBio-1064)(DMSO)]₂ (**2a**) apresenta dois complexos de zinco(II) binucleares na unidade cristalina assimétrica, onde as hidrazonas estão coordenadas na sua forma dianiônica. Em ambos os complexos, as hidrazonas são essencialmente planas, com desvio máximo com relação ao plano de 0,074 Å para [Zn(LASSBio-1064)(H₂O)]₂ e 0,082 Å para [Zn(LASSBio-1064)(DMSO)]₂.

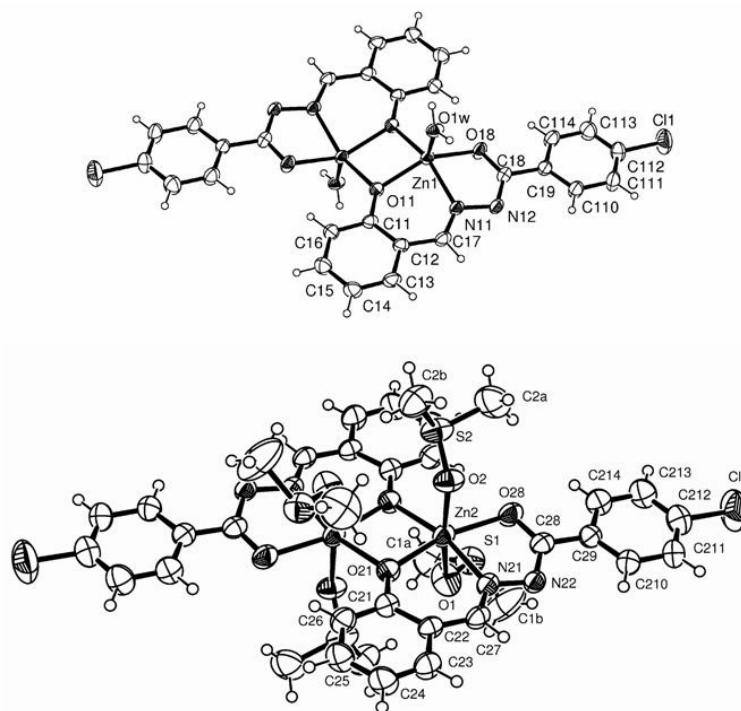


Figura 3.5. Diagrama ORTEP de [Zn(LASSBio-1064)(H₂O)]₂·[Zn(LASSBio-1064)(DMSO)]₂ (**2a**).

Em [Zn(LASSBio-1064)(H₂O)]₂, verifica-se que a coordenação da molécula de água ao zinco(II) resulta na desprotonação em N(2)-H com liberação do co-ligande Cl. Da mesma forma,

a coordenação de DMSO em $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$ também resultou na desprotonação da hidrazona e liberação do co-ligante Cl .

No complexo binuclear $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{H}_2\text{O})]_2$, o zinco apresenta uma geometria piramidal de base quadrada. A base da pirâmide é ocupada pelos átomos de oxigênio dos grupos carbonil e fenolato e o nitrogênio imínico de uma hidrazona. A quarta posição de coordenação é ocupada pelo oxigênio do grupo fenolato da segunda hidrazona presente no dímero. A molécula de água deste complexo encontra-se coordenada ao zinco no eixo da pirâmide e o metal desloca-se da base piramidal para junto da molécula de água em 0,597(4) Å. A distância metal-metal deste dímero é 3,122(2) Å.

No dímero $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$, o metal apresenta geometria octaédrica, onde o plano equatorial é formado pelo nitrogênio imínico e pelos átomos de oxigênio carbonil e fenolato de uma molécula de hidrazona, bem como o oxigênio do grupo fenolato da segunda hidrazona presente na estrutura. As posições axiais de cada centro de zinco são compostas por duas moléculas de DMSO. Os íons zinco(II) encontram-se muito próximos do plano equatorial, com desvio de apenas 0,024(4) Å. A distância entre os átomos de zinco(II) é 3,118(2) Å.

Os comprimentos de ligação $\text{Zn-O}_{\text{carb}}$ e $\text{Zn-O}_{\text{fenol}}$ são 2,022(5) e 2,066(5) Å para $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{H}_2\text{O})]_2$ e 2,098(5) e 2,070(5) Å para $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$, respectivamente. A distância Zn-N é 2,060(5) Å para $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{H}_2\text{O})]_2$ e 2,056(5) Å para $[\text{Zn}(\text{LASSBio-1064})(\text{DMSO})_2]_2$. Estes valores estão próximos dos valores observados para complexos de zinco similares.^{12,14,27}

²⁷ J.-H. Wang, P.-F. Yan, G.-M. Li, J.-W. Zhang, P. Chen, M. Suda, Y. Einaga, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 3706.

Tabela 3.7. Comprimento de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados do complexo [Zn(LASSBio-1064)(H₂O)]₂·[Zn(LASSBio-1064)(DMSO)₂] (2a)

Atom	(2a)	Atom	(2a)
O(11)-C(11)	1,343(8)	C(21)-O(21)	1,336(8)
C(12)-C(17)	1,462(11)	C(22)-C(27)	1,438(10)
C(17)-N(11)	1,285(9)	C(27)-N(21)	1,287(9)
N(11)-N(12)	1,378(8)	N(21)-N(22)	1,382(8)
N(12)-C(18)	1,328(9)	N(22)-C(28)	1,325(9)
C(18)-O(18)	1,266(8)	C(28)-O(28)	1,278(8)
C(18)-C(19)	1,486(10)	C(28)-C(29)	1,466(10)
O(11)-Zn(1)#1	1,994(4)	O(21)-Zn(2)#2	2,024(5)
O(11)-Zn(1)	2,066(5)	O(21)-Zn(2)	2,068(5)
O(18)-Zn(1)	2,023(5)	O(28)-Zn(2)	2,098(5)
Zn(1)-O(11) #1	1,994(5)	Zn(2)-O(21)#2	2,024(5)
Zn(1)-N(11)	2,060(5)	Zn(2)-N(21)	2,056(5)
Zn(1)-Zn(1) #1	3,1218(15)	Zn(2)-Zn(2)#2	3,1178(16)
C(12)-C(17)-N(11)	123,9(6)	C(22)-C(27)-N(21)	126,0(6)
C(17)-N(11)-N(12)	117,3(6)	C(27)-N(21)-N(22)	116,6(5)
N(11)-N(12)-C(18)	109,2(5)	N(21)-N(22)-C(28)	112,1(5)
N(12)-C(18)-O(18)	125,2(7)	N(22)-C(28)-O(28)	124,6(7)
N(12)-C(18)-C(19)	118,7(6)	N(22)-C(28)-C(29)	116,2(6)
C(19)-C(18)-O(18)	116,1(6)	C(29)-C(28)-O(28)	119,1(6)
O(18)-Zn(1)-N(11)	76,4(2)	O(28)-Zn(2)-N(21)	76,9(2)
O(11)#1-Zn(1)-O(18)	105,4(2)	O(21)#2-Zn(2)-O(28)	116,32(19)
O(11)#1-Zn(1)-O(11)	79,5(2)	O(21)#2-Zn(2)-O(21)	80,73(19)
O(11)-Zn(1)-O(18)	148,6(2)	O(21)-Zn(2)-O(28)	162,94(18)
N(11)-Zn(1)-O(11)	86,9(2)	N(21)-Zn(2)-O(21)	86,2(2)
O(11)#1-Zn(1)-N(11)	155,5(2)	O(21)#2-Zn(2)-N(21)	165,5(2)
O(11)#1-Zn(1)-Zn(1)#1	40,59(14)	O(21)#2-Zn(2)-Zn(2)#2	40,89(13)
O(18)-Zn(1)-Zn(1)#1	137,20(16)	O(28)-Zn(2)-Zn(2)#2	157,21(13)
N(11)-Zn(1)-Zn(1)#1	123,05(17)	N(21)-Zn(2)-Zn(2)#2	125,75(17)
O(11)-Zn(1)-Zn(1)#1	38,90(12)	O(21)-Zn(2)-Zn(2)#2	39,84(12)
O(1W)-Zn(1)-O(11)#1	107,1(2)	O(21)#2-Zn(2)-O(2)	89,2(2)
O(1W)-Zn(1)-O(18)	101,2(2)	N(21)-Zn(2)-O(2)	97,9(2)
O(1W)-Zn(1)-N(11)	96,3(2)	O(21)-Zn(2)-O(2)	93,9(2)
O(1W)-Zn(1)-O(11)	107,1(2)	O(28)-Zn(2)-O(2)	86,3(2)
O(1W)-Zn(1)-Zn(1)#1	112,43(16)	O(21)#2-Zn(2)-O(1)	87,9(2)
		N(21)-Zn(2)-O(1)	87,7(2)
		O(21)-Zn(2)-O(1)	97,7(2)
		O(28)-Zn(2)-O(1)	84,1(2)
		O(2)-Zn(2)-O(1)	167,5(2)

3.2 Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória das hidrazonas derivadas de salicilaldeído e seus complexos de zinco(II)

A atividade antinociceptiva das hidrazonas livres e seus complexos de zinco(II) foi avaliada usando três modelos de dor bem aceitos, denominados constrição induzida por ácido acético, nocicepção induzida por formaldeído e teste de placa quente. A constrição abdominal induzida por ácido acético e o teste de placa quente foram realizados para ajudar na investigação

da atividade periférica e central, respectivamente, enquanto que o modelo de nocicepção induzida por formaldeído é válido para detectar ambos os efeitos. Estudos de peritonite induzida por zimosano também foram conduzidos para avaliar a potencial atividade anti-inflamatória dos compostos.

Os compostos foram avaliados a uma dose de 100 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ (*per os*). Indometacina (100 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, *per os*), um inibidor seletivo de ciclooxigenase 1 (COX-1), e dipirona (100 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, *per os*), um inibidor seletivo de COX-3, foram utilizadas como drogas de referência nos modelos de nocicepção periférica. Por sua vez, morfina (15 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, i.p.) foi usada como referência para o teste de placa quente.

No modelo de constrição abdominal induzida por ácido acético, a atividade antinociceptiva é caracterizada pela inibição do número de constrições realizadas pelo camundongo após administração de ácido acético na cavidade peritoneal do animal. Conforme verificado na Tabela 3.8, todos os compostos estudados inibiram fortemente a nocicepção neste modelo animal.

Tabela 3.8. Efeito das hidrazonas H₂LASSBio-466 e H₂LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) na constrição abdominal induzida por ácido acético em camundongos

Composto	n	Número de constrição	Porcentagem de inibição
Controle	6	37,5 ± 1	—
Indometacina	6	6,0 ± 3**	84,0 ± 8**
Dipirona	6	8,3 ± 3**	77,8 ± 7**
H ₂ LASSBio-466	6	14,8 ± 2**	60,4 ± 6**
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	6	6,6 ± 1**	82,3 ± 4**
H ₂ LASSBio-1064	6	7,0 ± 1**	81,3 ± 3**
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	6	10,8 ± 2**	70,9 ± 6**
[Zn(LASSBio-1064)] ₂ (3)	6	8,2 ± 1**	78,1 ± 3**

A atividade antinociceptiva foi favorecida pela complexação no caso de **1**, o qual apresentou uma atividade maior que a hidrazona livre H₂LASSBio-466. Por outro lado, a coordenação de H₂LASSBio-1064 ao zinco(II) não promoveu melhora na atividade antinociceptiva dos compostos.

Com o intuito de avaliar mais detalhadamente o perfil antinociceptivo das substâncias testadas, ensaios de nocicepção induzida por formaldeído foram realizados (Tabela 3.9). Este modelo apresenta duas fases distintas, sendo a resposta nociceptiva decorrente da administração de formaldeído na pata do camundongo. A primeira fase, denominada fase neurogênica, é

geralmente inibida por fármacos com perfil de ação central.^{28,29} Por sua vez, a segunda fase possui um maior caráter inflamatório, sendo inibida principalmente por fármacos anti-inflamatórios e, também, por anticonvulsivantes.³⁰

Tabela 3.9. Efeito das hidrazonas H₂LASSBio-466 e H₂LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) na nocicepção induzida por formaldeído em camundongos

Composto	n	Fase 1	Porcentagem de inibição - Fase 1	Fase 2	Porcentagem de inibição - Fase 2
Controle	5	54,8 ± 2	—	227,6 ± 23	—
Indometacina	5	57,1 ± 8	0	115,9 ± 3*	49,1 ± 1*
H ₂ LASSBio-466	5	29,3 ± 8**	46,5 ± 8**	182,4 ± 17	19,8 ± 10
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	5	40,6 ± 13	25,9 ± 16	142,8 ± 23*	37,3 ± 10*
H ₂ LASSBio-1064	5	25,7 ± 5*	53,1 ± 9*	117,0 ± 19*	48,5 ± 8*
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	5	39,6 ± 8	27,7 ± 13	161,3 ± 36	29,2 ± 14
[Zn(LASSBio-1064)] ₂ (3)	5	60,0 ± 5	0	139,6 ± 26	38,7 ± 12

H₂LASSBio-466 inibiu estatisticamente apenas a primeira fase, enquanto seu complexo [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (1), assim como a indometacina, foi ativo na segunda fase, indicando sua habilidade em inibir nocicepção associada com resposta inflamatória. Desta forma, a complexação mostrou-se uma boa estratégia para melhorar a atividade antinociceptiva associada com dor inflamatória da hidrazona H₂LASSBio-466.

A hidrazona H₂LASSBio-1064 inibiu ambas as fases neurogênica e inflamatória, apresentando um perfil farmacológico distinto. No entanto, este efeito não foi observado para seus correspondentes complexos (2) e (3), indicando que a coordenação reduziu a atividade nociceptiva de H₂LASSBio-1064.

A avaliação do efeito central das hidrazonas e seus complexos de zinco(II) também foi realizada através do teste de placa quente, utilizando-se morfina como fármaco de referência. Esse modelo avalia o tempo que o camundongo demora em responder ao estímulo nociceptivo após ser colocado em uma placa com temperatura igual a 54 °C. Conforme verificado na Tabela 3.10, nenhum dos compostos avaliados, com exceção da morfina, aumentou estatisticamente o período de latência dos animais. Estes resultados demonstram que os compostos estudados não apresentam atividade nesse modelo de nocicepção central.

²⁸ M. Shibata, T. Ohkubo, H. Takahashi, R. Inoki, Pain, 1998. 38 (1998) 347.

²⁹ L.T.S. Rocha, K.A. Costa, A.C.P. Oliveira, E.B. Nascimento Jr, C.M. Bertollo, F. Araújo, L.R. Teixeira, S.P. Andrade, H. Beraldo, M.M. Coelho, Life Sci., 79 (2006) 499.

³⁰ G. Blackburn-Munro, N. Ibsen, H.K. Erichsen, Eur. J. Pharmacol. 445 (2002) 231.

Tabela 3.10. Efeito das hidrazonas H₂LASSBio-466 e H₂LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) no teste da placa quente em camundongos

Composto	n	0 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.
Controle	6	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,4	1,7 ± 0,1
Morfina	6	1,8 ± 0,5	9,0 ± 2*	7,4 ± 0,8*	5,3 ± 0,8*	2,5 ± 0,2
H ₂ LASSBio-466	6	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,1
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	6	2,1 ± 0,2	4,2 ± 0,8	2,4 ± 0,6	3,6 ± 0,6	5,4 ± 1
H ₂ LASSBio-1064	6	1,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,3	3,5 ± 0,3
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	6	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,5	2,9 ± 1	1,9 ± 0,2
[Zn(LASSBio-1064)] ₂ (3)	6	2,0 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,7	3,0 ± 1	2,1 ± 0,4

Para investigar a possível atividade anti-inflamatória dos compostos, nós realizamos o ensaio de peritonite induzida por zimosano (Tabela 3.11). Este estudo é amplamente utilizado como modelo inflamatório, onde a administração de zimosano na cavidade peritoneal induz um processo inflamatório, ocasionando o recrutamento tempo-dependente de células migratórias. Assim, a atividade antinociceptiva é caracterizada pela diminuição do número de células migratórias na cavidade peritoneal 6 horas após a administração dos compostos. Todas as substâncias testadas apresentaram capacidade de inibir a migração de células deste modelo comparável ou superior à indometacina. No entanto, um aumento da atividade anti-inflamatória não foi observado após a coordenação das hidrazonas ao zinco(II). Assim, a complexação não se mostrou uma boa estratégia para redução de dose neste modelo inflamatório.

Tabela 3.11. Efeito das hidrazonas H₂LASSBio-466 e H₂LASSBio-1064 e seus complexos de zinco(II) na peritonite induzida zimosano em camundongos

Composto	n	Número de células (10 ⁶ /mL)	Porcentagem de inibição
Controle	7	38,0 ± 1,0	—
Salina	7	5,0 ± 0,8	—
Indometacina	7	17,7 ± 1**	53,4 ± 3**
H ₂ LASSBio-466	7	11,4 ± 1**	70,0 ± 4**
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	7	10,7 ± 2**	71,8 ± 5**
H ₂ LASSBio-1064	7	8,4 ± 0,9**	77,8 ± 2**
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	7	13,4 ± 1**	64,7 ± 4**
[Zn(LASSBio-1064)] ₂ (3)	7	9,2 ± 1**	75,8 ± 4**

Capítulo 4. Complexos de gálio(III) de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina: avaliação de suas atividades antimicrobiana, citotóxica e antimalárica

O comportamento químico do gálio(III) é muito próximo ao do ferro(III) em termos de carga, diâmetro do íon e número de coordenação, fazendo com que alguns sistemas biológicos sejam incapazes de distinguir entre esses dois íons. No entanto, gálio(III) não é facilmente reduzido como ferro(III) e, por isso, não participa de processos redox, interrompendo o metabolismo celular.^{1,2} Desta forma, a utilização do gálio é uma boa estratégia para perturbar o metabolismo de ferro nas células.

Conforme mencionado anteriormente, gálio é o segundo metal utilizado no tratamento de câncer.³ Além disso, outras atividades farmacológicas, tais como a atividade antimicrobiana^{4,5} e atividade antimalárica⁶, também estão sendo associadas a compostos de gálio. No entanto a farmacocinética desfavorável do nitrato de gálio impede seu uso generalizado na quimioterapia.

As hidrazonas pertencem a uma classe de compostos que apresenta muitas atividades farmacológicas⁷ e a coordenação do gálio(III) a esses compostos pode ser uma estratégia promissora na busca por novos agentes terapêuticos. De fato, a literatura relata que o complexo de gálio(III) com piridoxal isonicotinoil hidrazona apresenta atividade antiproliferativa superior à do nitrato de gálio utilizado na clínica.⁸

Neste capítulo relatamos a caracterização de seis complexos de gálio(III) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina. A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra o fungo *Candida albicans*. O efeito da coordenação ao gálio(III) também foi estudado contra as células de glioblastoma U87 e T98 e contra o parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*. No último caso, dada a importância do metabolismo de ferro em *P. falciparum*, vários quelatores de ferro têm sido explorados como potenciais antimaláricos. Porém, esses quelatores podem ligar-se a outros metais essenciais presentes *in vivo*, resultando na privação desses nutrientes requeridos pelo homem.⁹ Considerando a capacidade do gálio(III)

¹ G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, F. Refosco, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 56.

² C.R. Chitambar, Int. J. Environ. Res. Public Health 7 (2010) 2337.

³ P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Crit. Rev. Oncol. Hemat. 42 (2002) 283-296.

⁴ Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P.K. Singh, J. Clin. Inv. 117 (2007) 877.

⁵ J.R. Haarrington, R.J. Martens, N.D. Cohen, L.R. Bernstein, J. Vet. Pharmacol. Therap. 29 (2006) 121.

⁶ S.E. Harpstrite, A.A. Beatty, S.D. Collins, A. Oksman, D.E. Goldberg, V. Sharma, Inorg. Chem. 42 (2003) 2294.

⁷ P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A.H. Cowley, R.R. Butorac, N. Dharmaraj, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 3376.

⁸ G.M. Knorr, C.R. Chitambar, Anticancer Res. 18 (1998) 1733.

⁹ S.E. Harpstrite, A.A. Beatty, S.D. Collins, A. Oksman, D.E. Goldberg, V. Sharma, Inorg. Chem. 42 (2003) 2294.

de perturbar o metabolismo do ferro(III), a estratégia de preparar compostos de gálio que pudessem perturbar processos bioquímicos do parasita pareceu-nos interessante.

A atividade citotóxica das hidrazonas e seus complexos de gálio(III) encontra-se publicada na *European Journal of Medicinal Chemistry* (ver Anexo).

4.1 Caracterização dos complexos de gálio(III) de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Foram obtidos complexos de gálio(III) com 2-acetilpiridina-fenil hidrazona (H2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenil hidrazona (H2Ac pClPh), 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenil hidrazona (H2Ac $\mathit{pNO}_2\mathit{Ph}$) e com as correspondentes hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2BzPh, H2Bz pClPh e H2Bz $\mathit{pNO}_2\mathit{Ph}$).

As hidrazonas usadas nas sínteses dos complexos já foram descritas na literatura.^{7,10,11} Desta forma, os espectros das mesmas são utilizados neste capítulo apenas para comparação com os espectros de seus respectivos complexos.

4.1.1 Análises

As microanálises dos complexos concordam com a presença de um átomo de gálio, duas moléculas de ligante na sua forma aniônica e um íon nitrato, o qual estaria presente como contraíon. A existência dos contraíons nas estruturas dos complexos é corroborada pelos valores de condutividade molar, os quais indicam que todos os complexos apresentam-se como eletrólitos do tipo 1:1.¹² Os valores obtidos para as microanálises e condutividades molares (Tabela 4.1) sugerem a formação dos complexos [Ga(2AcPh)₂]NO₃·H₂O (**1**), [Ga(2Ac pClPh)₂]NO₃·H₂O (**2**), [Ga(2Ac $\mathit{pNO}_2\mathit{Ph}$)₂]NO₃·1,5H₂O (**3**), [Ga(2BzPh)₂]NO₃·2H₂O (**4**), [Ga(2Bz pClPh)₂]NO₃·2H₂O (**5**) e [Ga(2Bz $\mathit{pNO}_2\mathit{Ph}$)₂]NO₃·H₂O (**6**) (Figura 4.1). As moléculas de água de hidratação propostas são confirmadas pelas curvas termogravimétricas, onde verifica-se a perda de massa equivalente a essas moléculas entre 30 e 100 °C.

¹⁰ A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

¹¹ J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D. N. Deobagkar, C. E. Anson, A. Powell, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 51.

¹² W. J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

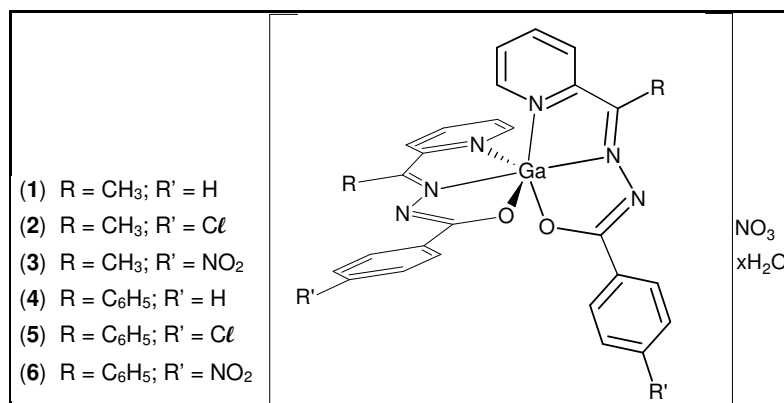


Figura 4.1. Estrutura genérica dos complexos de gálio(III) das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.

Tabela 4.1. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, termogravimetria**, massa molar e condutividade molar das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III)

Composto	Rend. (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	TG (% de perda de massa)	MM (g mol ⁻¹)	Λ _M (cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹)
1	59	> 300 (151,9-153,2)	53,43 (53,70)	4,21 (4,18)	15,66 (15,66)	2,53 (2,87)	626,27	73,30
2	66	> 300 (172,9-173,9)	48,15 (48,38)	3,61 (3,48)	14,14 (14,10)	2,41 (2,59)	695,16	82,98
3	68	> 300 (221,0-223,3)	46,37 (46,95)	3,47 (3,38)	17,38 (17,60)	3,58 (3,72)	725,27	71,54
4	42	> 300 (143,3-146,8)	58,99 (59,39)	4,22 (4,20)	12,87 (12,76)	4,52 (4,69)	768,43	71,07
5	52	> 300 (167,2-168,7)	54,21 (54,51)	3,59 (3,61)	11,80 (11,71)	4,08 (4,30)	837,32	83,86
6	73	> 300 (231,5-233,2)	55,06 (54,31)	3,78 (3,36)	14,93 (15,00)	2,03 (2,14)	840,41	77,31

* Ponto de fusão dos respectivos ligantes entre parênteses; ** Valores teóricos entre parênteses.

4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os complexos [Ga(2AcPh)₂]NO₃·H₂O (**1**), [Ga(2Ac Cl Ph)₂]NO₃·H₂O (**2**), [Ga(2Ac pNO_2 Ph)₂]NO₃·1,5H₂O (**3**), [Ga(2BzPh)₂]NO₃·2H₂O (**4**), [Ga(2Bz pCl Ph)₂]NO₃·2H₂O (**5**) e [Ga(2Bz pNO_2 Ph)₂]NO₃·H₂O (**6**) foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, COSY e HMQC.

Os espectros dos complexos e aqueles das hidrazonas de partida foram obtidos em DMSO-*d*₆ exceto o espectro de RMN de ¹³C para H2Bz pCl Ph e RMN de ¹H e ¹³C para H2Bz pNO_2 Ph, as quais apresentaram baixa solubilidade em DMSO e, por isso, seus espectros de RMN foram obtidos em CDCl₃. No entanto, os complexos de gálio(III) dessas hidrazonas não são solúveis em clorofórmio e, desta forma, não é possível avaliar os deslocamentos dos sinais

para **5** e **6** após a coordenação. Para os demais complexos de gálio(III) com as hidrazonas (**1-4**), verificam-se variações nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C similares, quando comparados com seus respectivos ligantes. A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das hidrazonas é apresentada na Figura 4.2.

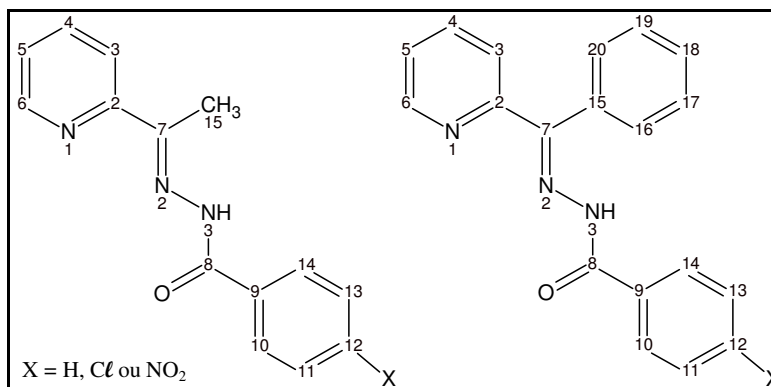


Figura 4.2. Estrutura genérica das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

Os espectros de RMN de ^1H de H2AcPh, H2AcPhCl e H2BzPh apresentam sinais duplicados, indicando a existência dos isômeros *E* e *Z* (Figura 4.3), conforme apresentado nas Tabelas 4.2 e 4.3. Na forma *E*, N(3)-H faz ligação de hidrogênio com o solvente, enquanto que no isômero *Z*, N(3)-H faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio heteroarômico.^{13,14}

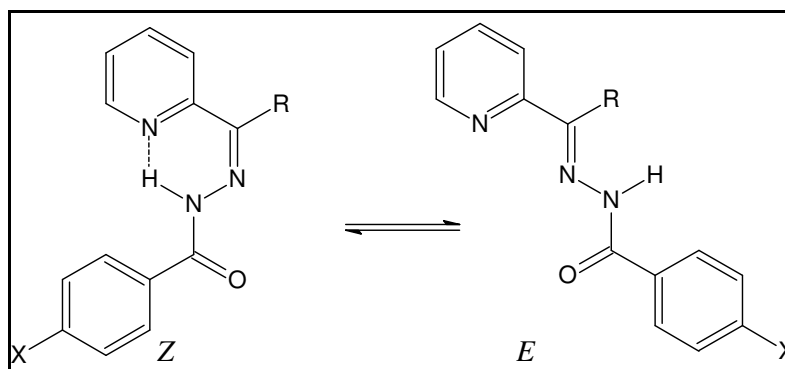


Figura 4.3. Representação dos isômeros configuracionais *E* e *Z* das hidrazonas.

¹³ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 2117.

¹⁴ A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos, verifica-se o desaparecimento do sinal referente ao N(3)-H, indicando que as hidrazonas encontram-se coordenadas ao metal na sua forma desprotonada.

Os espectros obtidos para todos os complexos apresentam apenas um sinal para cada hidrogênio, concordando com a forma *E* do ligante. Isto sugere que as hidrazonas coordenam-se ao centro metálico através do sistema quelante $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-O}$. Este tipo de coordenação também é suportado pelos deslocamentos observados nos espectros de RMN de ^{13}C para a maioria dos sinais referentes aos carbonos da piridina, bem como os dos carbonos C7 e C8.

A ausência de sinais duplicados para os hidrogênios dos complexos também revela que as duas moléculas de ligante coordenadas ao gálio são equivalentes.

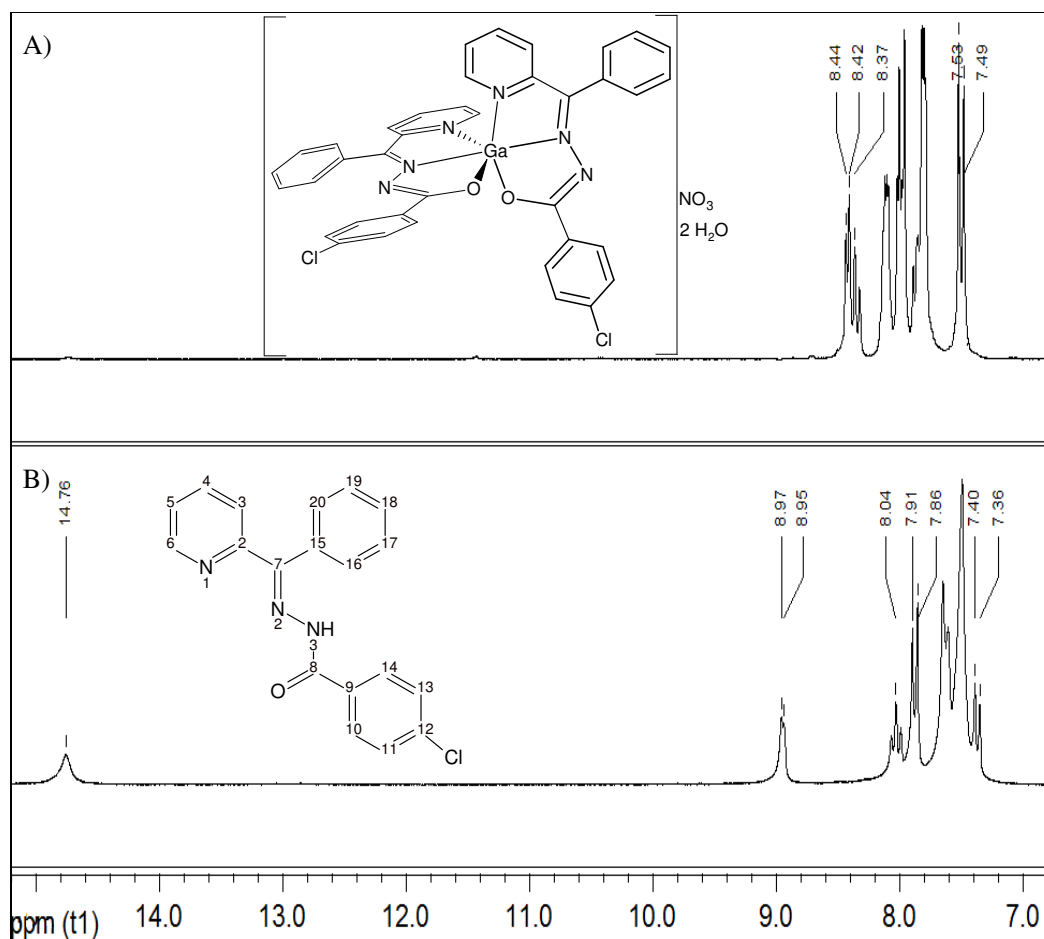


Figura 4.4. Espectros de RMN de ^1H A) do complexo $[\text{Ga}(\text{2BzpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5) e B) da hidrazona $\text{H}_2\text{BzpClPh}$ obtidos em $\text{DMSO-}d_6$.

Tabela 4.2. Atribuições, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^1H obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III)

Atribuição	Nº de H	H2AcPh		1	H2AcpClPh		2	H2AcpNO ₂ Ph		3
		Z	E		Z	E		E		
N(3)-H	1	15,80	10,90	----	15,86	10,96	----	11,21	----	
H3	1	7,86	8,14	8,23	----	8,10	8,22	8,16	8,34-8,28	
H4	1	8,12	7,85	8,42	----	7,84	8,40	7,91	8,46	
H5	1	7,61	7,42	7,76	----	7,43	7,76	7,47	7,82	
H6	1	8,91	8,66	8,48	8,92	8,62	8,47	8,64	8,55	
C(15)-H ₃	3	2,49	2,46	3,06	----	2,47	3,04	2,50	3,11	

Tabela 4.3. Atribuições, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^1H das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e dos seus complexos de gálio(III). Espectros obtidos em $\text{DMSO}-d_6^*$ ou CDCl_3^{**}

Atribuição	Nº de H	H2BzPh*		4*	H2BzpClPh*	5*	H2BzpNO ₂ Ph**	6*
		Z	E					
N(3)-H	1	14,72	10,15	----	14,76	----	15,46	----
H3	1	7,62	7,89	8,01-7,99	7,91-7,86	7,99-7,95	8,32	8,06
H4	1	8,03	7,90	8,36	8,04	8,34	7,87	8,40
H5	1	7,40	7,37	7,85	7,38	7,83	7,45	7,90
H6	1	8,95	8,48	8,41	8,96	8,39	8,83	8,49

Tabela 4.4. Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 obtidos em $\text{DMSO}-d_6$ das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III)

Atribuição	DEPT	H2AcPh		1	H2AcpClPh	2	H2AcpNO ₂ Ph	3
		Z	E					
C2	----	152,4	155,0	154,4	154,9	155,0	154,8	156,9
C3	↑	124,7	120,2	125,6	120,2	125,7	120,4	123,7
C4	↑	138,6	136,5	143,8	136,5	143,9	136,6	144,4
C5	↑	124,7	124,0	128,2	124,0	128,9	124,2	129,2
C6	↑	147,7	148,5	146,2	148,5	146,3	148,6	146,5
C7	----	144,6	143,4	145,5	144,3	145,4	149,1	145,2
C8	----	164,0	162,5	172,9	163,1	171,9	162,7	171,1
C15	↑	12,4	22,1	13,7	12,6	13,7	12,8	14,0

Tabela 4.5. Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e dos seus complexos de gálio(III). Espectros obtidos em $\text{DMSO-}d_6^*$ ou CDCl_3^{**}

Atribuição	DEPT	H2BzPh*		4*	H2BzpClPh**		5*	H2BzpNO ₂ Ph**	6*
		Z	E		Z	E			
C2	----	151,75	155,10	151,2	153,01	-	151,9	153,05	154,0
C3	↑	127,11	124,93	126,8	126,15	124,33	127,5	124,24	129,2
C4	↑	138,32	136,68	143,9	137,61	136,42	144,1	137,90	144,6
C5	↑	126,29	124,01	130,8	126,88	124,50	130,1	124,62	131,4
C6	↑	148,71	148,53	146,9	149,08	147,77	147,1	147,81	147,8
C7	----	148,07	-	145,2	148,26	148,54	145,2	149,86	145,4
C8	----	162,87	-	174,2	163,28	-	173,3	162,41	172,9

4.1.3 Espectroscopia de Infravermelho

As bandas no espectro de infravermelho mais importantes para a determinação do modo de coordenação das hidrazonas ao gálio(III) estão presentes na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) dos complexos $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{Ga}(\text{2AcpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{Ga}(\text{2AcpNO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**3**), $[\text{Ga}(\text{2BzPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{Ga}(\text{2BzpClPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{Ga}(\text{2BzpNO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**6**)

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{NO}_3)$	$\nu(\text{Ga-N}_{\text{azom.}})$	$\nu(\text{Ga-O})$	$\nu(\text{Ga-N}_{\text{py}})$
H2AcPh	3178	1654	1580	620	---	---	---	---
1	---	---	1602	648	1384	422	327	235
H2AcpClPh	3287	1659	1588	623	---	---	---	---
2	---	---	1600	648	1384	420	317	219
H2AcpNO ₂ Ph	3186	1667	1601	619	---	---	---	---
3	---	---	1603	649	1384	410	317	227
H2BzPh	3063	1687	1576	614	---	---	---	---
4	---	---	1600	649	1384	423	326	235
H2BzpClPh	3064	1686	1592	615	---	---	---	---
5	---	---	1597	650	1385	422	298	234
H2BzpNO ₂ Ph	3105	1680	1603	654	---	---	---	---
6	---	---	1603	653	1385	410	317	227

Comparando-se o espectro de infravermelho de **6** com o espectro de seu respectivo ligante H2BzpNO₂Ph, verifica-se que a complexação não provoca muitas variações. Isto pode ser decorrente da presença do grupo nitro na estrutura do ligante, o qual tem efeito retirador de elétrons. No entanto, a obtenção deste complexo pode ser confirmada pelas demais análises

apresentadas neste capítulo, como a ressonância magnética nuclear e a análise elementar. Para os demais complexos (**1** a **5**), verifica-se que a complexação provoca mudanças significativas nos espectros de infravermelho quando comparados com os espectros das hidrazonas livres.

As bandas referentes ao modo $\nu(\text{CO})$ presentes em $1687\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das hidrazonas livres desaparecem nos espectros dos complexos, indicando a coordenação de oxigênio como enolato. A complexação também provoca o deslocamento do modo $\nu(\text{CN})$, de acordo com a coordenação da hidrazona ao gálio por meio do nitrogênio imínico.^{14,15} Novas bandas observadas para os complexos em $423\text{-}410\text{ cm}^{-1}$ e $327\text{-}298\text{ cm}^{-1}$ são relacionadas aos modos $\nu(\text{Ga-N})$ e $\nu(\text{Ga-O})$, respectivamente.¹⁶

Mudanças no modo de deformação no plano do anel da piridina, que se desloca de $654\text{-}614\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das hidrazonas para $653\text{-}648\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerem que as hidrazonas também coordenam-se ao metal pelo nitrogênio heteroaromático.^{17,18} Esta ligação é confirmada pelo aparecimento de novas bandas nos espectros dos complexos em $235\text{-}219\text{ cm}^{-1}$, atribuídas às vibrações $\nu(\text{Ga-N}_{\text{py}})$.^{19,20}

Desta forma, os dados obtidos através dos espectros de infravermelho sugerem que os ligantes coordenam-se ao metal de modo tridentado, pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-O}$. A presença do grupo nitrato na estrutura dos complexos é indicada pelas absorções características em $1384\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$, as quais não aparecem nos espectros das hidrazonas livres.¹⁶

4.1.4 Cristalografia de Raios X

Cristais da hidrazona $[\text{H}_2\text{2AcPNO}_2\text{Ph}]\text{NO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ adequados para a difração de raios X foram obtidos da solução de etanol proveniente da síntese de $[\text{Ga}(\text{2AcPNO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**3**). Após recristalização do complexo $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]\text{NO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**) em etanol, monocristais adequados para determinação estrutural por difração de raios X contendo o composto $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ (**1a**) também foram obtidos.

Os dados cristalográficos de $\text{H}_2\text{2AcPNO}_2\text{Ph}\cdot\text{NO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ foram coletados em um difratômetro Oxford Xcalibur *GEMINI*, CCD, enquanto os dados cristalográficos de

¹⁵ A.P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698.

¹⁶ K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. 4th ed. New York: Wiley, 1986.

¹⁷ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, J. Mol. Struct. 920 (2009) 97.

¹⁸ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 3797.

¹⁹ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

²⁰ J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301.

[Ga(2AcPh)₂]⁺ foram obtidos em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD. Os resumos da coleção de dados e refinamento^{21,22,23,24,25,26} são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Resumo da coleção de dados e de refinamento da hidrazona [H₂2AcpNO₂Ph]NO₃·H₂O e do complexo [Ga(2AcPh)₂]⁺ (**1a**)

Composto	[H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O	(1a)	
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₇	C ₂₈ H ₂₄ GaN ₆ O ₂	
Massa molecular	365,31	546,25	
Temperatura, K	296(2)	293(2)	
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	
Grupo espacial	P2 _{1/c}	Pī	
Dimensões da célula unitária	a, Å	14,1490(6)	11,632(1)
	b, Å	8,3457(3)	12,137(1)
	c, Å	15,4448(6)	12,161(1)
	α, °	90	65,624(5)
	β, °	113,989(5)	103,179(5)
	γ, °	90	111,515(4)
Volume, Å ³	1666,22(11)	1523,6(2)	
Z, Densidade calc., Mg/m ³	4, 1456	2	
μ, mm ⁻¹	0,119	0,935	
F(000)	760	562	
Tamanho do cristal, mm	0,23 x 0,15 x 0,06	0,245 x 0,079 x 0,070	
Intervalo de θ (°)	3,30 – 26,00	2,79 – 25,99	
	-15 ≤ h ≤ 17	-13 ≤ h ≤ 14	
Intervalo de hkl	-10 ≤ k ≤ 7	-14 ≤ k ≤ 14	
	-18 ≤ l ≤ 18	-14 ≤ l ≤ 14	
Qualidade de ajuste, S	1,019	1,011	
Reflexões medidas/únicas (R _{int})	7639/3260 (0,0269)	14431/5938 (0,0640)	
Parâmetros ref. / restrições	244 / 0	336 / 0	
R [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0536; wR ₂ = 0,1213	R ₁ = 0,0494; wR ₂ = 0,1220	
R (all)	R ₁ = 0,0918; wR ₂ = 0,1444	R ₁ = 0,0769; wR ₂ = 0,1318	
Δρ min. / max., eÅ ⁻³	0,226 / -0,277	0,302 / -0,403	

²¹ Enraf-Nonius (1997-2000). COLLECT. Nonius BV, Delft, The Netherlands.

²² Z. Otwinowski, W. Minor, In Methods in Enzymology, 276. Ed: C.W. Carter, Jr., R.M. Sweet pp. 307-326, New York: Academic Press, 1997.

²³ A.L. Spek, PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, The Netherlands, 1998.

²⁴ G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution. University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997.

²⁵ G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis. University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997.

²⁶ CrysAlisPro, Oxford Diffraction Ltd., versão 1.171.33.48 (15-09-2009 CrysAlis171 .NET).

O diagrama ORTEP $[\text{H}_2\text{2AcpNO}_2\text{Ph}]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ é apresentado na Figura 4.5 e os comprimentos e ângulos de ligação selecionados encontram-se nas Tabelas 4.8 e 4.9. A hidrazona cristalizou-se na forma de um sal ($\text{H}_2\text{L}^+\text{NO}_3^-$) através da protonação do nitrogênio da piridina, apresentando configuração *E*.

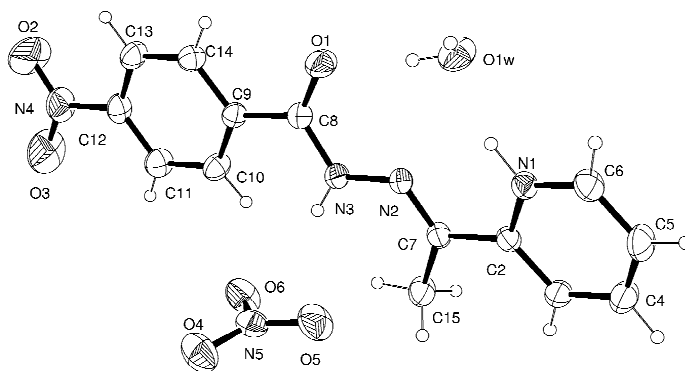


Figura 4.5. Diagrama ORTEP de $[\text{H}_2\text{2AcpNO}_2\text{Ph}]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

A estrutura cristalina é estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares, conforme apresentado na Figura 4.6. O esqueleto da hidrazona é quase planar com desvio *rms* igual a 0,106 Å. Os comprimentos e ângulos de ligação entre os átomos que compõem o esqueleto da hidrazona estão de acordo com os de outras hidrazonas, conforme observado por $\text{H}_2\text{AcPh}^{11}$ (ver Tabelas 4.8 e 4.9).

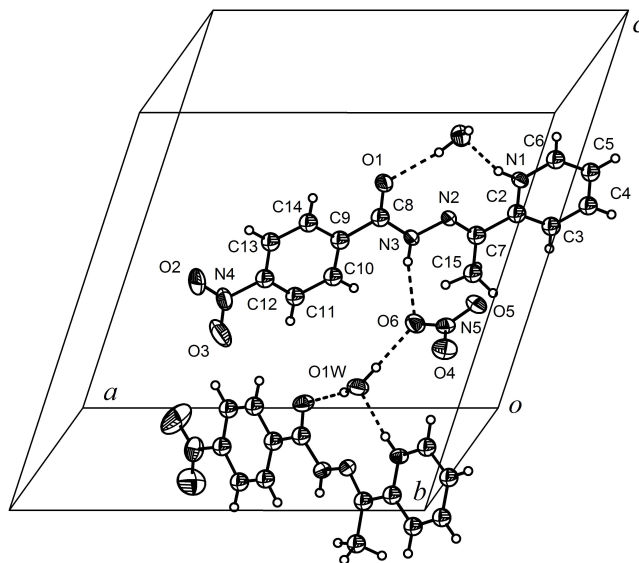


Figura 4.6. Empacotamento molecular de $[\text{H}_2\text{2AcpNO}_2\text{Ph}]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

O diagrama ORTEP de $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ (**1a**) é apresentado na Figura 4.7. O mapa de Fourier do complexo $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ revela que o contra-íon e possíveis moléculas de solvente estão severamente distorcidos na rede cristalina. Esta desordem não pode ser adequadamente modelada e, desta forma, o refinamento da estrutura possibilitou apenas a determinação do cátion $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$.

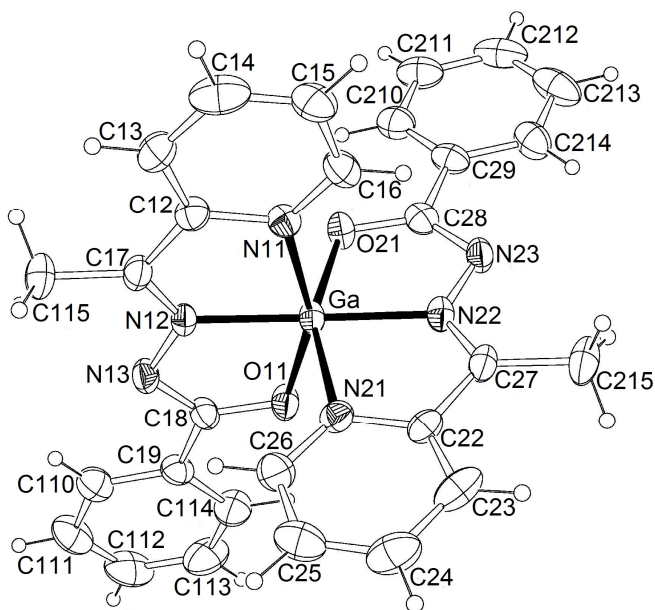


Figura 4.7. Diagrama ORTEP do cátion $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ (**1a**).

A estrutura do complexo **1a** revela que o íon gálio(III) está coordenado a duas hidrazonas aniônicas através do sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-O}$, onde as hidrazonas encontram-se na forma *E*. A geometria do composto é descrita como octaédrica distorcida, onde os átomos de oxigênio encontram-se *cis* entre si, com o ângulo $\text{O}(11)\text{-Ga}(1)\text{-O}(21)$ de $94,72(10)^\circ$ e *trans* aos átomos de nitrogênio piridínicos. Os ângulos $\text{O}(11)\text{-Ga-N}(11)$ de $155,86(10)^\circ$ e $\text{O}(21)\text{-Ga-N}(21)$ de $156,00(10)^\circ$ diferenciam-se do valor ideal de 180° provavelmente devido às restrições espaciais do sistema quelante.

A distância de ligação $\text{C}(8)\text{-O}(1)$ na hidrazona H2AcPh ($1,219(2) \text{ \AA}$)¹¹ sofre um alongamento após a coordenação ao gálio [$\text{C}(18)\text{-O}(11) = 1,295(4)$ e $\text{C}(28)\text{-O}(21) = 1,296(4) \text{ \AA}$]. Por outro lado, a distância da ligação $\text{N}(3)\text{-O}(1)$ de $1,347(3) \text{ \AA}$ em H2AcPh se reduz para $1,321(4)$ e $1,326(4) \text{ \AA}$ no complexo (**1a**). Essa redução é decorrente do caráter de dupla adquirido por esta ligação após a desprotonação da hidrazona em $\text{N}(3)\text{-H}$ e coordenação ao gálio(III).

Tabela 4.8. Ângulos de ligação (°) selecionados das hidrazonas [H₂2AcpNO₂Ph]NO₃·H₂O e H₂AcPh¹¹ e do complexo [Ga(2AcPh)₂]⁺. Desvios padrão entre parênteses

Átomos	[H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O	H ₂ AcPh ¹¹	Átomos	[Ga(2AcPh) ₂] ⁺ (1a)
C(2)-C(7)-N(2)	113,74(19)	114,47(15)	C(12)-C(17)-N(12)	113,3(3)
			C(22)-C(27)-N(22)	113,3(3)
C(7)-N(2)-N(3)	117,78(18)	119,02(14)	C(17)-N(12)-N(13)	121,4(3)
			C(27)-N(22)-N(23)	122,5(3)
N(2)-N(3)-C(8)	118,51(18)	117,02(13)	N(12)-N(13)-C(18)	108,0(2)
			N(22)-N(23)-C(28)	108,4(2)
N(3)-C(8)-O(1)	122,7(2)	123,32(15)	N(13)-C(18)-O(11)	125,1(3)
			N(23)-C(28)-O(21)	124,6(3)
N(3)-C(8)-C(9)	115,5(2)	115,99(13)	N(13)-C(18)-C(19)	116,3(3)
			N(23)-C(28)-C(29)	117,6(3)
O(1)-C(8)-C(9)	121,8(2)	120,68(18)	O(11)-C(18)-C(19)	118,7(3)
			O(21)-C(28)-C(29)	117,8(3)
			O(11)-Ga-O(21)	94,72(10)
			O(11)-Ga-N(12)	79,10(9)
			O(21)-Ga-N(12)	106,78(10)
			O(11)-Ga-N(22)	107,92(9)
			O(21)-Ga-N(22)	78,88(10)
			N(12)-Ga-N(22)	170,87(10)
			O(11)-Ga-N(21)	92,47(10)
			O(21)-Ga-N(21)	156,00(10)
			N(12)-Ga-N(21)	97,05(10)
			N(22)-Ga-N(21)	77,11(10)
			O(11)-Ga-N(11)	155,86(10)
			O(21)-Ga-N(11)	92,98(10)
			N(12)-Ga-N(11)	76,77(10)
			N(22)-Ga-N(11)	96,01(10)
			N(21)-Ga-N(11)	89,69(10)

Tabela 4.9. Comprimentos de ligação (Å) selecionados das hidrazonas [H₂2AcpNO₂Ph]NO₃·H₂O e H₂AcPh¹¹ e do complexo [Ga(2AcPh)₂]⁺. Desvios padrão entre parênteses

Átomos	H ₂ 2AcpNO ₂ Ph·NO ₃ ·H ₂ O	H ₂ AcPh ¹⁰	Átomos	[Ga(2AcPh) ₂] ⁺ (1a)
C(2)-C(7)	1,480(3)	1,487(2)	C(12)-C(17)	1,461(5)
			C(22)-C(27)	1,481(5)
C(7)-N(2)	1,279(3)	1,264(3)	C(17)-N(12)	1,287(4)
			C(27)-N(22)	1,281(4)
N(2)-N(3)	1,367(3)	1,375(2)	N(12)-N(13)	1,378(3)
			N(22)-N(23)	1,379(3)
N(3)-C(8)	1,360(3)	1,347(3)	N(13)-C(18)	1,321(4)
			N(23)-C(28)	1,326(4)
C(8)-O(1)	1,219(3)	1,219(2)	C(18)-O(11)	1,295(4)
			C(28)-O(21)	1,296(4)
C(12)-N(4)	1,475(3)	---	Ga-O(11)	1,956(2)
			Ga-O(21)	1,960(2)
			Ga-N(11)	2,139(3)
			GaN(21)	2,115(3)
			Ga-N(12)	1,975(2)
			Ga-N(22)	1,988(2)

Tabela 4.10. Distâncias de ligações de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para a hidrazona [H₂2AcpNO₂Ph]NO₃·H₂O. Desvios padrão entre parênteses

Composto	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	(D-H...A)
[H ₂ 2AcpNO ₂ Ph]NO ₃ ·H ₂ O	N(1)-H(1)···O(1) _w	0,961	1,750	2,678	161,39
	N(3)-H(3)···O(6)	0,800	2,231	2,927	145,64
	O(1) _w -H(1A)···O(6) ⁱ	0,860	1,955	2,812	174,28
	O(1) _w -H(1B)···O(1)	0,884	2,045	2,920	170,48

Transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes: i: x, ½-y, ½+z.

4.2 Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e antimalárica das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de gálio(III)

4.2.1 Atividade Antimicrobiana

As atividades dos complexos de gálio contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como contra o fungo *Candida albicans*, foram avaliadas

seguindo o procedimento descrito na parte experimental.²⁷ As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas para os complexos e seus ligantes com o intuito de avaliar quantitativamente os efeitos da complexação sobre a atividade *in vitro*.

Os compostos estudados não apresentaram atividade frente à bactéria gram-negativa *P. aeruginosa*. Os valores de CIM dos compostos contra *S. aureus* e *C. albicans* são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Concentração inibitória mínima (CIM) das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina, seus complexos de gálio(III), cloridrato de tetraciclina e fluconazol contra *S. aureus* (ATCC6538) e *C. albicans* (ATCC18804)

Composto	CIM / $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
H2AcPh	428	213
[Ga(2AcPh) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (1)	159	77
H2AcpClPh	197	46
[Ga(2AcpClPh) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (2)	73	9
H2AcpNO ₂ Ph	353	> 179
[Ga(2AcpNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·1,5H ₂ O (3)	146	34
H2BzPh	169	> 68
[Ga(2BzPh) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (4)	68	131
H2BzpClPh	> 158	> 31
[Ga(2BzpClPh) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (5)	68	32
H2BzpNO ₂ Ph	> 75	> 18
[Ga(2BzpNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (6)	> 63	> 12
Cloridrato de tetraciclina	0,3	----
Fluconazol	----	33

As hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina já tiveram suas atividades frente a *S. aureus* e *C. albicans* descritas por outros membros do nosso grupo.¹⁰ Conforme relatado, as atividades antimicrobianas seguem a ordem H2AcPh < H2AcpNO₂Ph < H2AcpClPh, sugerindo que o efeito retirador de elétrons dos grupos nitro e cloro pode favorecer a atividade contra esses microorganismos. A baixa solubilidade das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina impossibilitou a obtenção das CIMs, impedindo a determinação da ordem de atividade antimicrobiana desses compostos.

²⁷ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

Os valores de CIM obtidos contra *S. aureus* sugerem que as hidrazonas estudadas e seus respectivos complexos de gálio(III) não apresentam atividade significativa. No entanto, é possível verificar uma pequena redução no valor da CIM após a complexação ao metal. As maiores atividades são verificadas para os complexos (4) e (5), os quais apresentam as hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina em suas estruturas.

Os resultados dos testes contra *C. albicans* mostram que a complexação reduz significativamente os valores de CIM obtidos para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina, sendo que o melhor resultado é observado para 2. No caso da hidrazona H2AcpClPh, o valor da CIM é similar ao do fármaco fluconazol. Após a coordenação, a atividade apresentada por 2 (CIM = 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) é superior àquela verificada pelo composto de referência (CIM = 33 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os valores de CIM obtidos para os complexos (1) e (3) são comparáveis ao de fluconazol.

A baixa solubilidade das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos de gálio(III) impossibilitou a determinação das CIMs desses compostos. Desta forma, uma comparação das atividades antifúngicas dos complexos com as dos seus respectivos ligantes não foi possível.

4.2.2 Atividade Citotóxica

Os efeitos citotóxicos das hidrazonas e seus complexos de gálio(III) foram investigados contra duas diferentes células de glioblastoma. Estudos prévios do genótipo da proteína p53 e da sensibilidade de linhagens de células cancerígenas humanas a fármacos antitumorais revelaram que células em que a proteína p53 está ausente ou que apresentam a proteína mutante são menos sensíveis à maioria dos compostos em uso clínico que as células que expressam essa proteína.²⁸ Por isso, as células escolhidas para a avaliação da atividade antitumoral dos compostos foram células U87, que expressam a proteína p53, e células T98, que expressam a proteína mutante.

Um estudo preliminar do efeito citotóxico das hidrazonas e seus complexos de gálio(III) foi realizado, onde a concentração dos compostos foi 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados são apresentados na Figura 4.8 como porcentagem de sobrevivência celular.

A porcentagem de sobrevivência das células U87 e T98 na presença das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina encontra-se entre 14,4 e 35,1 %. Por sua vez, a sobrevivência celular na presença das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina foi superior a 54,8 %.

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

Todos os complexos de gálio(III) apresentaram atividade citotóxica frente as células U87 superior à atividade exercida pelas hidrazonas livres, com sobrevivência celular entre 4,4 e 30,4 %. Os resultados obtidos para as células T98 revelam que o efeito citotóxico das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III) são comparáveis, indicando que a coordenação não melhorou a atividade. Por outro lado, a coordenação ao gálio(III) aumentou a atividade citotóxica das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina contra essas células.

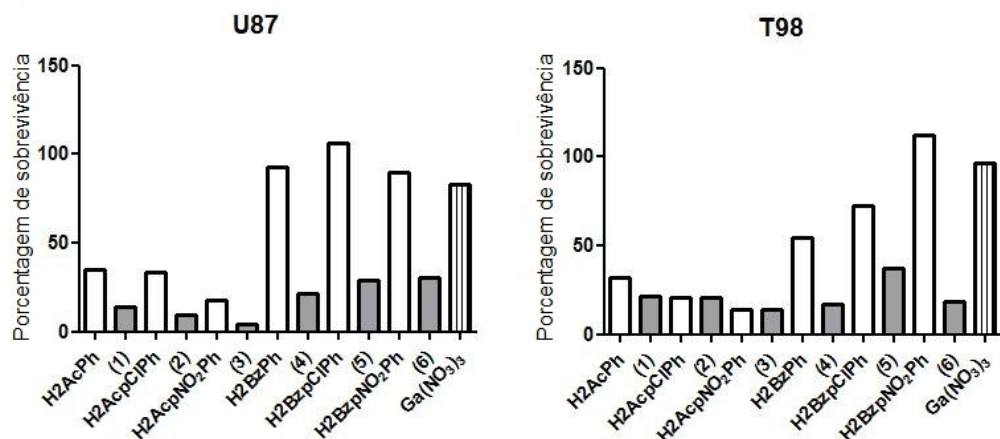


Figura 4.8. Efeito citotóxico das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de gálio(III) contra as células de glioblastoma U87 e T98. As células foram tratadas com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por um período de 48 horas e a sobrevivência celular foi medida pelo método MTT.

Esses estudos estimularam a determinação da concentração dos compostos capaz de matar 50 % das células estudadas (IC_{50}). No entanto, valores de IC_{50} dos complexos de gálio(III) não foram determinados devido à sua baixa solubilidade. Além disso, os valores de IC_{50} das hidrazonas contra células de fibroblastos humano MRC5, as quais atuam como um modelo de células saudáveis, também foram determinados. Etoposídeo, fármaco antineoplásico em uso clínico, foi utilizado como controle positivo. Os valores de IC_{50} das hidrazonas frente às células U87, T98 e MRC5 são apresentados na Tabela 4.12.

Todas as hidrazonas, exceto H2Bz pNO_2 Ph, são altamente ativas contra as células de glioblastoma estudadas, com valores de IC_{50} entre 0,07 e 26,1 nmol L^{-1} contra células U87 e entre 0,43 e 415 nmol L^{-1} contra células T98. Esses valores de IC_{50} são inferiores ao valor observado para o etoposídeo, indicando que as hidrazonas foram mais ativas que o composto de referência.

As hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina foram mais ativas que as correspondentes derivadas de 2-benzoilpiridina frente todas as linhagens celulares. H2Ac $pC\ell$ Ph foi a hidrazona

mais citotóxica frente às células U87, enquanto H2Ac ρ NO₂Ph foi o composto mais ativo contra as células T98.

Os valores de IC₅₀ das hidrazonas frente a células MRC5 foram muito maiores que aqueles verificados frente às células de glioblastoma. De fato, os índices terapêuticos (IT = IC_{50MRC5}/IC_{50glioma}) da maioria das hidrazonas foram muito altos. Uma vez que o índice terapêutico é utilizado como um padrão de segurança de um fármaco, as hidrazonas utilizadas podem ser consideradas bons candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento de tumores cerebrais.

Tabela 4.12. Valores de IC₅₀ (nmol L⁻¹) para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e etoposídeo frente a células de glioblastoma U87 e T98 e frente a células de fibroblastos humano MRC5

Composto	Linhagem celular de glioblastoma		Células de fibroblastos de pulmão de feto humano MRC5	Índice de Terapêutico (IT)*	
	U87	T98		U87	T98
H2AcPh	0,94 ± 0,01	0,80 ± 0,07	284 ± 15	302	355
H2Ac ρ ClPh	0,07 ± 0,01	1,17 ± 0,3	348 ± 37	4971	297
H2Ac ρ NO ₂ Ph	0,57 ± 0,07	0,43 ± 0,04	283 ± 33	496	658
H2BzPh	8,26 ± 1	7,41 ± 0,4	1180 ± 127	143	159
H2Bz ρ ClPh	26,1 ± 15	415 ± 31	738 ± 13	28	1,8
H2Bz ρ NO ₂ Ph	> 500	> 500	551 ± 53	---	---
Etoposídeo	620 ± 15	460 ± 25	---	---	---

*IT = IC_{50MRC5}/IC_{50glioma}

Modificações fenotípicas significativas foram observadas em ambas as linhagens celulares de glioblastoma, mas não nas células MRC5, após exposição aos compostos testados. Conforme mostrado na Figura 4.9, as células do grupo controle apresentam expansões citoplasmáticas, enquanto o tratamento com as hidrazonas causou retração dessas expansões, levando ao arredondamento das células, o encolhimento celular e formação de bolhas das células de U87 e T98. Essas mudanças morfológicas apresentam uma tendência dose-resposta e são associadas com morte celular por apoptose. Uma redução do número de células após o tratamento também foi observado.

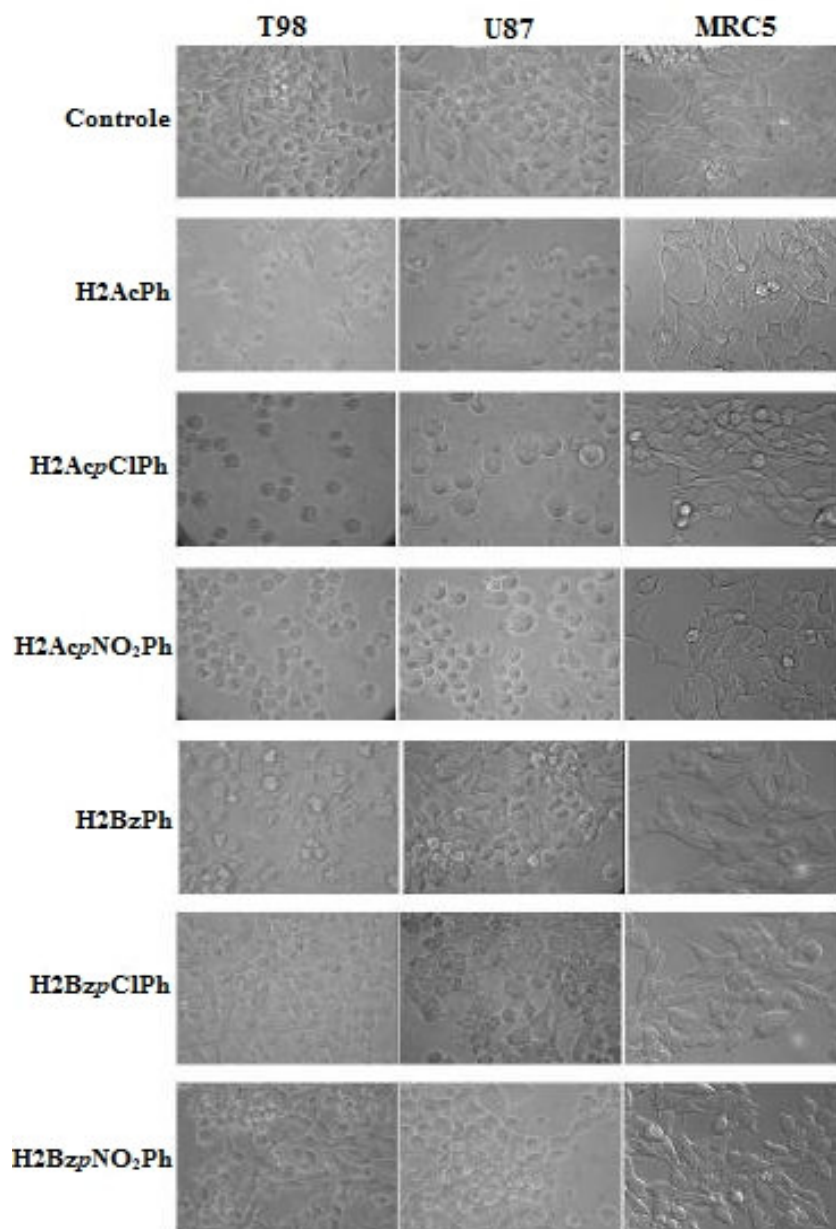


Figura 4.9. Células de glioblastoma U87 e T98 e células de fibroblastos humano MRC5 tratadas com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina. Amplificação: 400 X.

A morte por via apoptótica induz fragmentação do DNA através da ativação de endonucleases específicas do DNA. A ativação de nucleases pode ser identificada através do uso de DNA corado com 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI), o qual detecta o DNA fragmentado e a condensação da cromatina.

Nenhuma fragmentação do DNA foi observada nas células do grupo controle (não tratadas com as hidrazonas) e nas células MRC5. No entanto, após exposição às hidrazonas, as células de glioblastoma mostraram fragmentação do DNA, conforme verificado na Figura 4.10

para H2AcpClPh frente a células U87. Esses resultados sugerem que a redução da sobrevivência celular após o tratamento ocorre, pelo menos em parte, devido à indução de apoptoses.

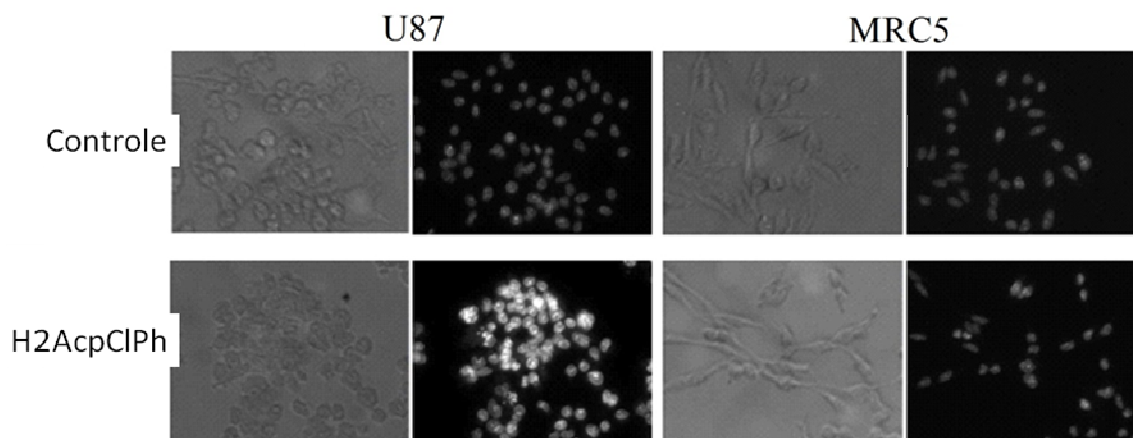


Figura 4.10. Células de glioblastoma U87 e células de fibroblastos humano MRC5 tratadas com H2AcpClPh e coradas com DAPI. Amplificação: 400 X.

Com o intuito de avaliar as propriedades estereo-eletrônicas que podem estar envolvidas no mecanismo de ação das hidrazonas, um estudo da relação estrutura-atividade (SAR) dos compostos foi realizado. As propriedades de interesse neste estudo foram as energias de HOMO e LUMO, o momento dipolo, a área de superfície e o logP das hidrazonas, as quais foram correlacionadas com os valores de IC₅₀. Essas propriedades foram calculadas segundo a metodologia descrita na seção 2.4.1 e seus valores são apresentados na Tabela 4.13.

Para a obtenção de matrizes de correlação, a existência dos isômeros *E* e *Z* das hidrazonas foi considerada. Analisando-se separadamente os isômeros *E* e *Z*, verifica-se a presença de uma correlação inversa entre o logP e a atividade das hidrazonas frente a ambas as linhagens celulares ($R = -0,73$ para U87 e $R = -0,93$ para T98). Correlação inversa também foi verificada entre a área de superfície e a atividade frente às células testadas ($R = -0,83$ frente às células U87 e $R = -0,82$ frente as células T98). Então, menores de valores de logP e área de superfície contribuem para um maior efeito citotóxico. De fato, as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina, as quais apresentam menores valores de logP e menores áreas superficiais, são mais ativas que as correspondentes derivadas de 2-benzoilpiridina.

Considerando-se os isômeros majoritários (isômero *E* para H2AcPh, H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph e isômero *Z* para H2BzPh, H2BzpClPh e H2BzpNO₂Ph), as correlações inversas foram novamente obtidas entre logP ou área de superfície e a atividade frente às células

investigadas. Além disso, a análise dos isômeros majoritários revelou uma nova correlação inversa entre o momento dipolo e a atividade das hidrazonas ($R = -0,84$ para U87 e T98).

Tabela 4.13. Propriedades estereo-eletrônicas calculadas para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Composto	ϵ (HOMO) (eV)*	ϵ (LUMO) (eV)	Momento dipolo (db)	LogP	Área de superfície (Å ²)
H2AcPh	-8,560 (isômero <i>E</i>)	1,978 (isômero <i>E</i>)	3,365 (isômero <i>E</i>)	1,92	342,28
	-8,545 (isômero <i>Z</i>)	1,780 (isômero <i>Z</i>)	5,308 (isômero <i>Z</i>)		
H2AcpClPh	-8,692 (isômero <i>E</i>)	1,813 (isômero <i>E</i>)	3,381 (isômero <i>E</i>)	2,53	359,09
	-8,689 (isômero <i>Z</i>)	1,632 (isômero <i>Z</i>)	6,672 (isômero <i>Z</i>)		
H2AcpNO ₂ Ph	-8,898 (isômero <i>E</i>)	0,803 (isômero <i>E</i>)	4,717 (isômero <i>E</i>)	2,15	383,15
	-8,933 (isômero <i>Z</i>)	0,998 (isômero <i>Z</i>)	8,855 (isômero <i>Z</i>)		
H2BzPh	-6,801 (isômero <i>E</i>)	1,558 (isômero <i>E</i>)	3,104 (isômero <i>E</i>)	3,10	419,37
	-6,620 (isômero <i>Z</i>)	1,344 (isômero <i>Z</i>)	4,976 (isômero <i>Z</i>)		
H2BzpClPh	-8,639 (isômero <i>E</i>)	1,814 (isômero <i>E</i>)	3,440 (isômero <i>E</i>)	3,68	436,41
	-8,346 (isômero <i>Z</i>)	1,527 (isômero <i>Z</i>)	6,386 (isômero <i>Z</i>)		
H2BzpNO ₂ Ph	-8,832 (isômero <i>E</i>)	0,833 (isômero <i>E</i>)	5,072 (isômero <i>E</i>)	3,31	459,15
	-8,549 (isômero <i>Z</i>)	0,955 (isômero <i>Z</i>)	8,585 (isômero <i>Z</i>)		

* eV = 627.51 Kcal mol⁻¹

4.2.3 Atividade Antimalárica

Uma avaliação da atividade contra malária foi realizada para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III). A escolha por esta classe de hidrazonas deveu-se à sua maior solubilidade quando em comparação com suas correspondentes derivadas de 2-benzoilpiridina.

A atividade antimalárica dos compostos foi avaliada através de culturas de eritrócitos parasitados com *Plasmodium falciparum*. Os resultados obtidos são expressos como concentração do composto capaz de inibir 50 % do crescimento dos parasitas (IC₅₀). A dose mínima capaz de matar 50 % das células de hepatoma humano HepG2 (LD₅₀) também foi determinada. Cloroquina, um antimalárico em uso clínico, foi utilizado como controle positivo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Valores experimentais de IC₅₀ frente *Plasmodium falciparum* e de LD₅₀ frente a células de hepatoma humano para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	LD ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Índice Terapêutico (IT)*
H2AcPh	0,690 ± 0,560	1145 ± 50	1659
1	0,399 ± 0,250	246 ± 40	616
H2Ac _p ClPh	0,731 ± 0,440	413 ± 26	565
2	0,367 ± 0,036	19 ± 1	52
H2Ac _p NO ₂ Ph	0,616 ± 0,440	3272 ± 246	5312
3	0,290 ± 0,026	6,0 ± 0,4	21
Ga(NO ₃) ₃	> 100	> 100	---
Cloroquina	0,188 ± 0,006	797 ± 16	4239

*IT = LD₅₀/IC₅₀

As hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III) foram ativos contra *P. falciparum*, apresentando valores de IC₅₀ entre 0,290 e 0,690 μmol L⁻¹. Comparando-se a atividade das hidrazonas livres com a dos seus respectivos complexos, verifica-se que a coordenação provoca uma pequena redução nos valores de IC₅₀ dos compostos. No entanto, esta diferença não é considerada significativa, uma vez que cada mol de complexo apresenta dois mols da hidrazona. Além disso, os complexos de gálio(III) apresentam valores de LD₅₀ entre 6,0 e 246 μmol L⁻¹, os quais são inferiores aos valores obtidos para as hidrazonas (413 a 3272 μmol L⁻¹), indicando que as hidrazonas são menos tóxicas que seus complexos.

A baixa toxicidade das hidrazonas é confirmada pelos elevados valores de índice terapêutico dos compostos, sugerindo que esses compostos inibem o crescimento do parasita sem provocar morte celular. Desta forma, o melhor resultado foi verificado para a hidrazona H2Ac₄NO₂Ph, a qual apresentou IT superior ao verificado para a cloroquina.

Os resultados obtidos indicam que a coordenação das hidrazonas ao gálio(III) não foi uma boa estratégia para redução de doses. Por outro lado, as hidrazonas testadas foram altamente ativas e seletivas, sugerindo que são potenciais agentes antimaláricos.

Capítulo 5. Complexos de gálio(III) e bismuto(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol): avaliação da atividade antiangiogênica

Angiogênese é um processo fundamental para o reparo e crescimento de tecidos, o qual consiste de recrutamento de células endoteliais a partir de um estímulo angiogênico. No entanto, se um ou mais destes processos são mantidos, novas lesões são causadas, resultando em condições inflamatórias crônicas.^{1,2}

Em uma variedade de condições patológicas, tais como artrite reumatóide, aterosclerose e doença de Crohn, inflamação e angiogênese atuam simultaneamente e sinergisticamente para manutenção das doenças.³ Desta forma, terapias que atenuam a angiogênese inflamatória e processos fibróticos podem prevenir a progressão ou manutenção de condições inflamatórias crônicas.

O lapachol é uma naftoquinona [2-hidro-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] extraída da casca de várias espécies de plantas do gênero *Tabebuia*, família Bignoneaceae.⁴ Conforme mencionado no capítulo da Introdução, o lapachol e seus derivados apresentam um amplo espectro de bioatividades, como ação antitumoral,⁵ antimicrobiana⁶ e antiprotozoária.⁷ Além disso, a atividade anti-inflamatória do lapachol foi verificada em estudos com modelos animais.⁸ No entanto, os efeitos colaterais apresentados pelo lapachol refletem um problema para o seu uso clínico.⁹

A complexação do lapachol a diferentes metais pode ser uma boa estratégia para a obtenção de compostos bioativos que apresentem menor toxicidade. Estudos revelam que gálio(III) e bismuto(III) apresentam potencial efeito anti-inflamatório. Nitrato de gálio(III) pode suprimir encefalomielite autoimune e prevenir artrite inflamatória adjuvante,^{10,11} enquanto o

¹ Y. Gong, D.-R. Koh, *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 437.

² J.B. Mendes, M.A. Rocha, F.A. Araújo, S.A.L. Moura, M.A.N.D. Ferreira, S.P. Andrade, *Microvasc. Res.* 78 (2009) 265.

³ D.O. Xavier, L.S. Amaral, M.A. Gomes, M.A. Rocha, P.R. Campos, B.D.C.V. Cota, L.S.A. Tafuri, A.M.R. Paiva, J.H. Silva, S.P. Andrade, A.V. Belo, *Biomed. Pharmacother.* 64 (2010) 220.

⁴ R.A.S. Oliveira, E. Azevedo-Ximenes, R. Luzzati, R.C. Garcia, *Int. Immunopharmacol.* 10 (2010) 1463.

⁵ K.V. Rao, T.J. McBridge, J.J. Oleson, *Cancer Res.* 28 (1968) 1952.

⁶ M.A.A. De Souza, A.R. Da Silva, M.A. Ferreira, M.J. De Lemos, R.G. Ramos, A.B.B. Ferreira, S.R. De Souza, *Química Nova* 31 (2008) 1670.

⁷ C. Salas, R.A. Tapia, K. Ciudad, V. Armstrong, M. Orellana, U. Kemmerling, J. Ferreira, J.D. Maya, A. Morello, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 668.

⁸ E.R. De Almeida, A.A. Da Silva Filho, E.R. Dos Santos, C.A.C. Lopes, *J. Ethnopharmacol.* 29 (1990) 239.

⁹ M. Maeda, M. Murakami, T. Takegami, T. Ota, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229 (2008) 232.

¹⁰ C. Whitacre, G. Apseloff, K. Cox, V. Matkovic, S. Jewell, N. Gerber, *J. Neuroimmunol.* 39 (1992) 175.

¹¹ V. Matkovic, A. Balboa, D. Clinchot, C. Whitacre, B. Zwilling, D. Brown, S.E. Weisbrode, G. Apseloff, N. Gerber, *Curr. Ther. Res.* 50 (1991) 255.

bismuto é eficiente contra as duas maiores desordens gastrointestinais inflamatórias, úlcera péptica e diarreia.¹²

Considerando os potenciais efeitos do gálio e bismuto na inflamação, neste capítulo são apresentadas as caracterizações dos complexos de gálio(III) e bismuto(III) de lapachol, bem como os efeitos destes compostos em um modelo de angiogênese inflamatória. Os resultados obtidos para o complexo de bismuto(III) já encontram-se publicados (ver Anexo).

5.1 Caracterização dos complexos de gálio(III) e bismuto(III) de 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol)

Os complexos $[Ga(Lp)_3] \cdot H_2O$ (**1**) e $[Bi(Lp)_2] \cdot Cl$ (**2**) foram obtidos, onde Lp representa uma molécula de lapachol desprotonada (lapacholato).

5.1.1 Análises

Os rendimentos, pontos de fusão, massas molares, microanálises e condutividades molares dos compostos são apresentados na Tabela 5.1. As propostas estruturais para os complexos (**1**) e (**2**) são apresentadas na Figura 5.1.

Tabela 5.1. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, massa molar e condutividade molar dos complexos de gálio(III) e bismuto(III) de lapachol

Composto	Rend. (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	MM (g mol ⁻¹)	Λ_M (cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹)
$[Ga(Lp)_3] \cdot H_2O$ (1)	43	192,5-194,0 (139,6-140,7)	66,71 (66,60)	5,08 (5,09)	811,52	8,81
$[Bi(Lp)_2]Cl$ (2)	94	> 300 (139,6-140,7)	49,01 (49,57)	3,60 (3,60)	726,96	77,35

* Ponto de fusão do lapachol entre parênteses; ** Valores teóricos entre parênteses

A faixa de temperatura de fusão verificada para o lapachol (139,6-140,7 °C) encontra-se próxima da relatada na literatura (141-143 °C),¹³ indicando que o composto estava puro. Os pontos de fusão dos compostos **1** e **2** indicam que um novo produto foi obtido após a síntese e mostram que esses complexos não apresentam lapachol como impureza.

¹² C.-H. Lin, Y.-H. Shen, S.-H. Wu, C.-H. Lin, S.-M. Hwang, Y.-C. Tsai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 830.

¹³ E.H. de Oliveira, G.E.A. Medeiros, C. Peppe, M.A. Brown, D.G. Tuck, *Can. J. Chem.* 75 (1997) 499.

As microanálises do complexo de gálio(III) sugerem a formação de um complexo contendo três moléculas de lapachol desprotonadas (lapacholato) e uma molécula de água como solvente de hidratação. A molécula de água de hidratação é confirmada por termogravimetria, onde observa-se uma perda de massa equivalente a 2,45 % (valor teórico: 2,22 %). Esta perda de massa ocorre entre 25 e 100 °C, o que caracteriza água de hidratação.

Os resultados de análise elementar do complexo de bismuto(III) concordam com um complexo contendo dois ânions lapacholato e um íon cloreto. A medida de condutividade molar de **2** revela que o composto é eletrólito 1:1, sugerindo que o íon cloreto não se encontra coordenado ao centro metálico.¹⁴

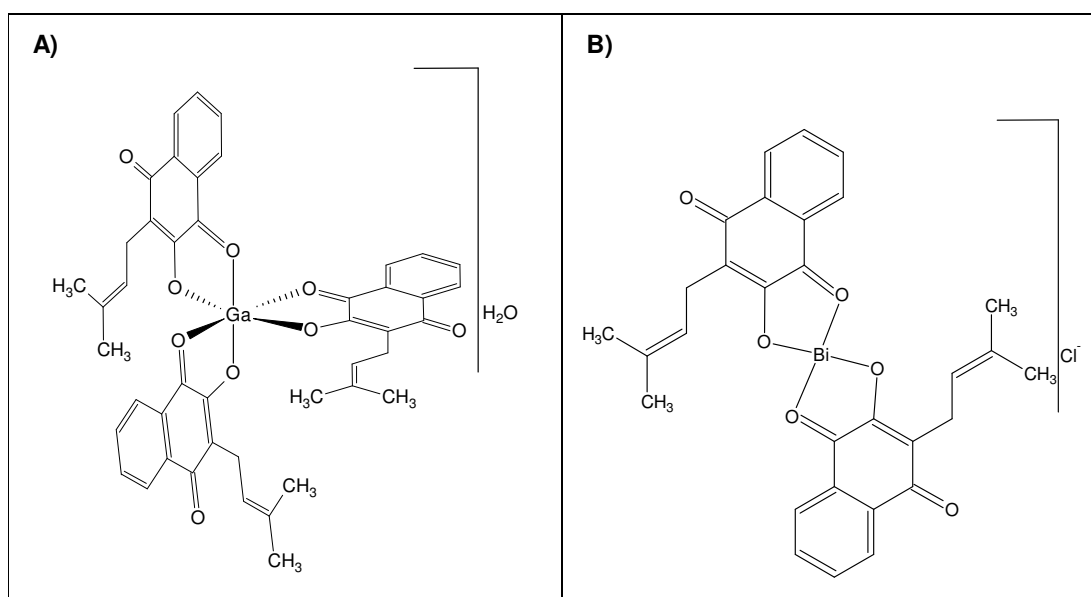


Figura 5.1. Estruturas propostas para A) o complexo de gálio(III) [Ga(Lp)₃].H₂O e B) o complexo de bismuto(III) [Bi(Lp)₂]Cl.

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

O complexo de gálio(III) de lapachol foi caracterizado por RMN de ¹H, em CDCl₃. Por sua vez, o espectro de RMN de ¹H do complexo de bismuto(III) foi obtido em DMSO-*d*₆, devido à maior solubilidade do composto neste solvente. Espectros de RMN de ¹H do lapachol foram obtidos em CDCl₃ e DMSO-*d*₆ e a numeração utilizada para atribuição dos átomos constituintes é apresentada na Figura 5.2. A obtenção de espectros de RMN de ¹³C dos complexos não foi possível devido à baixa solubilidade dos mesmos.

¹⁴ W.J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

A pureza do lapachol é verificada através dos espectros de RMN de ^1H , onde são observados os sinais característicos do grupo prenila, bem como os sinais de hidrogênios aromáticos.¹⁵

Com a coordenação, observam-se os deslocamentos de todos os sinais de hidrogênio da molécula de lapachol para ambos os complexos (**1** e **2**), conforme apresentado na Tabela 5.2. Verifica-se que as mudanças mais significativas ocorrem para os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, sugerindo a coordenação do lapachol ao centro metálico.

A Figura 5.3 apresenta o espectro de RMN de ^1H do complexo de bismuto(III) $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ e do lapachol, obtidos em $\text{DMSO-}d_6$.

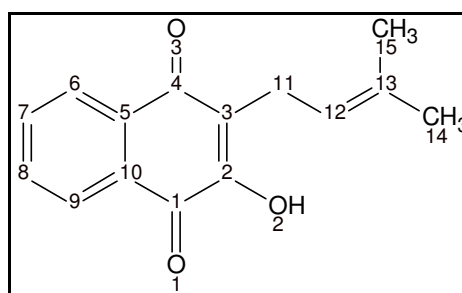


Figura 5.2. Estrutura do lapachol e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

Tabela 5.2. Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H do lapachol e dos seus complexos de gálio(III) (em CDCl_3) e bismuto(III) (em $\text{DMSO-}d_6$)

Atribuição	$[\text{Ga}(\text{Lp})_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Lp, CDCl_3)	$[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ (Lp, $\text{DMSO-}d_6$)
H6	8,13-8,05 (7,98)	7,80 (7,96-7,91)
H7	7,61 (7,59)	7,57 (7,82-7,70)
H8	7,81 (7,59)	7,71 (7,82-7,70)
H9	8,13-8,05 (7,98)	7,87 (7,96-7,91)
H11	3,34 (3,19)	3,10 (3,13)
H12	5,20 (5,10)	5,11 (5,10)
H14 e H15	1,67 e 1,53 (1,68 e 1,57)	1,65 e 1,51 (1,69 e 1,60)

¹⁵ A.C. Micheletti, A. Beatriz, D.P. De Lima, N.K. Honda, C.O. Pessoa, M.O. De Moraes, L.V. Lotufo, H.I.F. Magalhães, N.C.P. Carvalho, Química Nova 32 (2009) 12.

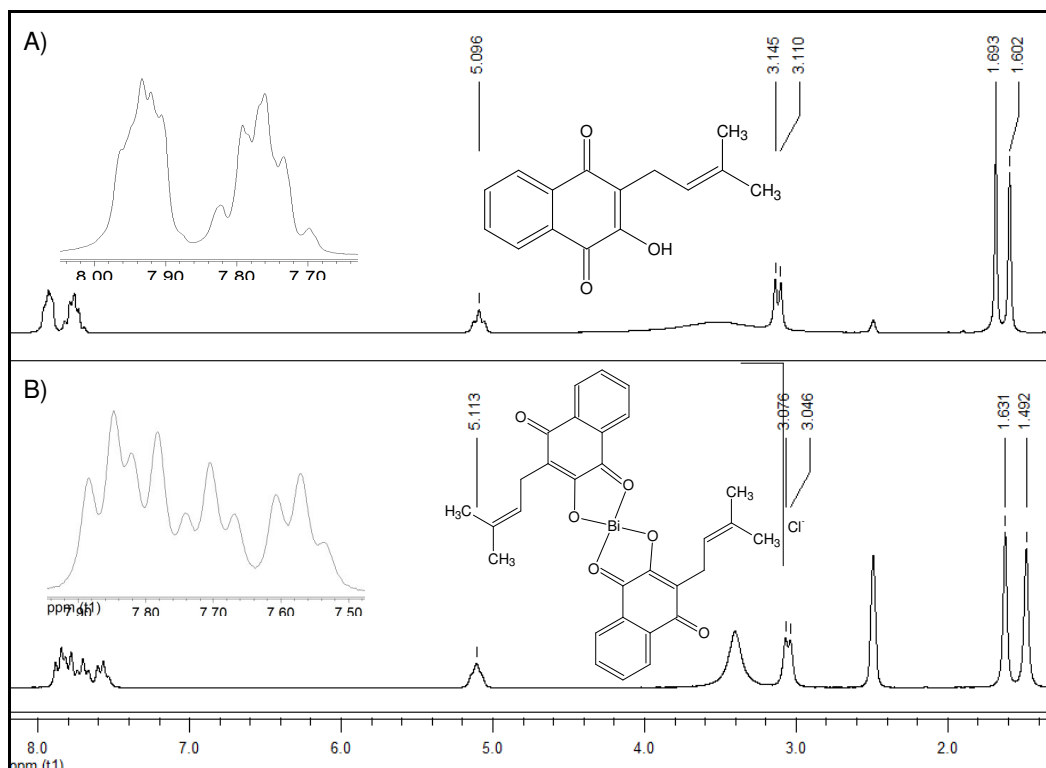


Figura 5.3. Espectros de RMN de ^1H A) do lapachol e B) do complexo $[\text{Bi}(\text{Lp})_2] \cdot \text{Cl}$ (**2**) obtidos em $\text{DMSO}-d_6$.

5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho

A atribuição das principais bandas de infravermelho do lapachol e seus complexos é apresentada na Tabela 5.3.

O estiramento $\nu(\text{C}-\text{O})$ aparece no espectro de infravermelho do lapachol em 1311 cm^{-1} . A coordenação provoca o deslocamento desta banda nos complexos, fazendo com que esta fique sobreposta com outras bandas existentes no lapachol. Este comportamento é verificado para outros compostos com lapacholato¹⁶ e impossibilita a atribuição do modo $\nu(\text{C}-\text{O})$ nos complexos. No entanto, o espectro do lapachol apresenta uma banda forte e relativamente estreita em 3352 cm^{-1} , a qual é referente ao modo $\nu(\text{O}-\text{H})$. Esta banda não é verificada nos espectros dos complexos, indicando a coordenação do ligante, o qual encontra-se na forma desprotonada (lapacholato), através do oxigênio do fenolato.

As bandas observadas em 1661 e 1639 cm^{-1} para o lapachol são atribuídas às carbonilas. Nos complexos (**1**) e (**2**) verifica-se que a banda localizada em maior número de onda desloca-se respectivamente para 1635 e 1634 cm^{-1} , decorrente da redução da ordem de ligação provocada

¹⁶ M. A. Martínez, M. C. L. de Jiménez, E. E. Castellano, O. E. Piro, P. J. Aymonino, J. Coord. Chem. 56 (2003) 803.

pela complexação. Para o complexo (**1**), a segunda banda apresenta um deslocamento muito superior (-65 cm^{-1}) àquele observado para a primeira banda (-26 cm^{-1}). Este deslocamento ocorre devido à ressonância $\text{O}2\text{-C}2\text{=C}3\text{-C}4\text{=O}3\leftrightarrow\text{O}2\text{=C}2\text{-C}3\text{=C}4\text{-O}3$, a qual provoca a redução da ordem de ligação do grupo C4O3 pelo mesomerismo com o grupo fenolato (ver atribuição na Figura 5.2). Este comportamento é também verificado para outros complexos com o ligante lapacholato.^{16,17} No complexo (**2**), o deslocamento da banda referente ao grupo C4O3 é inferior (-16 cm^{-1}) ao observado para **1**, indicando a diminuição ou ausência de mesomerismo em **2**. Estes resultados indicam que a complexação ocorre através dos átomos de oxigênio O1 e O2, conforme proposto anteriormente (Figura 5.1).

A banda correspondente à deformação fora do plano das ligações C-H do anel encontra-se em 724 cm^{-1} no espectro do lapachol e é deslocada para regiões de maiores energias nos espectros dos complexos (735 cm^{-1} para **1** e 729 cm^{-1} para **2**). Após a complexação, novas bandas foram observadas em 447 e 460 cm^{-1} para **1** e 472 e 489 cm^{-1} para **2**. Estas bandas são atribuídas ao modo $\nu(\text{M-O})$, confirmando a coordenação do ligante ao metal através dos átomos de oxigênio.

Tabela 5.3. Atribuição das principais bandas de infravermelho do lapachol e seus complexos de gálio(III) e bismuto(III), obtidos em pastilhas de KBr (dadas em cm^{-1})

Composto	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C=O})$	$\omega(\text{C-H}_{\text{arom.}})$	$\nu(\text{M-O})$
Lapachol (HLp)	3352	1661, 1639	724	---
$[\text{Ga}(\text{Lp})_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1)	---	1635, 1574	735	460, 447
$[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ (2)	---	1634, 1623	729	489, 472

5.2 Avaliação da atividade antiangiogênica do lapachol e seus complexos de gálio(III) e bismuto(III)

A atividade antiangiogênica do lapachol, seus complexos de gálio(III) e bismuto(III) e os sais $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e BiCl_3 foi investigada utilizando-se um modelo animal de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja. Este modelo tem sido amplamente utilizado para induzir respostas inflamatórias crônicas, permitindo a caracterização dos principais componentes do tecido fibrovascular.^{18,19}

¹⁷ F. Caruso, M. A. Martínez, M. Rossi, A. Goldberg, M. E. C. Villalba, P. J. Aymonino, Inorg. Chem. 48 (2009) 3529.

¹⁸ A.V. Belo, F. Leles, L.S. Barcelos, M.A.N.D. Ferreira, Y.S. Bakhle, M.M. Teixeira, S.P. Andrade, Microcirculation 12 (2005) 597.

¹⁹ M.A. Ferreira, L.S. Barcelos, M.M. Teixeira, Y.S. Bakhle, S.P. Andrade, Life Sci. 81 (2007) 210.

5.2.1 Atividade Antiangiogênica

A atividade antiangiogênica dos compostos foi determinada através da avaliação da extensão da vascularização dos implantes, onde detectou-se a quantidade de hemoglobina no tecido.

Inicialmente, a atividade antiangiogênica foi estudada através da administração *per os* dos compostos, utilizando-se uma dose de lapachol de 25 mg/Kg/dia.²⁰ Doses equivalentes ao lapachol foram utilizadas para os demais compostos.

Após tratamento *per os* (lapachol 25 mg/Kg/dia), apenas o complexo [Bi(Lp)₂]Cl (2) reduziu estatisticamente a quantidade de hemoglobina nos implantes, conforme observado na Figura 5.4. Os grupos tratados com lapachol, [Ga(Lp)₃]H₂O (1) e os sais Ga(NO₃)₃ e BiCl₃ não foram capazes de diminuir a neovascularização dos implantes.

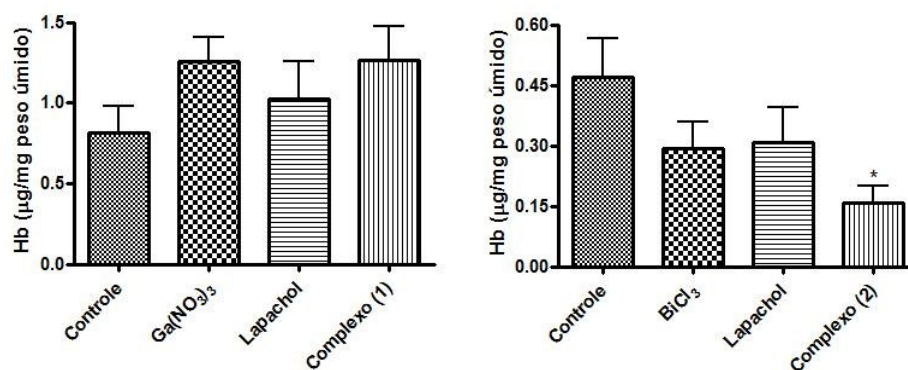


Figura 5.4. Efeitos na vascularização dos implantes induzidos pelo lapachol, seus complexos de gálio(III) (1) e bismuto(III) (2) e os sais Ga(NO₃)₃ e BiCl₃ no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja (n = 6-8) para tratamento *per os*, utilizando-se uma dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol. Estatisticamente diferente em comparação com o grupo controle: *P < 0,05.

Os resultados obtidos para o tratamento *per os* estimularam a avaliação de efeitos dose-resposta. No entanto, doses maiores dos compostos não foram utilizadas visto que altas doses de lapachol (80-100 mg/dia) apresentam efeitos tóxicos.⁹ Por isso, novos experimentos *per os* foram realizados, utilizando-se doses dez vezes menores de lapachol, seu complexo [Bi(Lp)₂]Cl (2) e o sal BiCl₃ (Figura 5.5). Neste caso, nenhuma diferença estatística foi verificada para os níveis de hemoglobina dos grupos tratados com relação ao grupo controle.

²⁰ D.P. Bezerra, A.P. Alves, N.M. De Alencar, R.O. Mesquita, M.W. Lima, C. Pessoa, M.O. De Moraes, J.N. Lopes, N.P. Lopes, L.V. Costa-Lotufo, J. Exp. Ther. Oncol. 7 (2008) 113.

Doses menores de $[\text{Ga}(\text{Lp})_3]\text{H}_2\text{O}$ (**1**) e $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ não foram utilizadas, pois nenhum dos dois compostos apresentou atividade na concentração de lapachol 25 mg/Kg/dia.

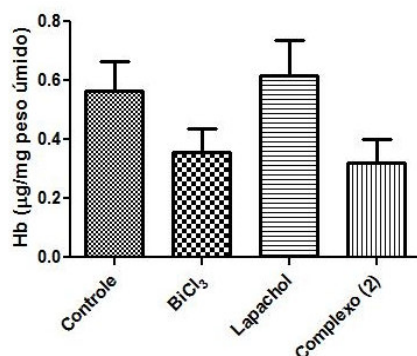


Figura 5.5. Efeitos na vascularização dos implantes induzidos pelo lapachol, seu complexo de bismuto(III) e o sal BiCl_3 no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja ($n = 6-8$) para tratamento *per os*, utilizando-se uma dose de lapachol igual a 2,5 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol.

Para continuação da investigação da atividade antiangiogênica do lapachol e seu complexo $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ (**2**), tratamento intraperitoneal (i.p.) foi realizado para lapachol 25 mg/Kg/dia e doses equivalentes de **2** e BiCl_3 . Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.6.

No tratamento i.p., a quantidade de hemoglobina nos implantes dos animais tratados com veículo foi $0,79 \pm 0,18 \mu\text{gHb mg}^{-1}$ de tecido úmido. A administração i.p. reduziu a neovascularização dos implantes para os animais tratados com lapachol e seu complexo de bismuto(III), onde os níveis de hemoglobina diminuíram cerca de 50 % em ambos os casos. Uma vez que não foi observada diferença estatística entre lapachol e $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ (**2**), a redução de neovascularização pode ser devido à presença de lapachol em ambos os grupos experimentais.

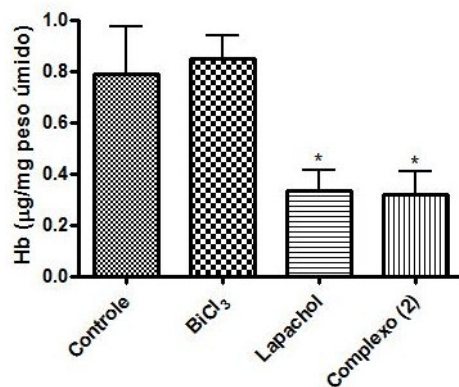


Figura 5.6. Efeitos na vascularização dos implantes induzidos pelo lapachol, seu complexo de bismuto(III) (2) e o sal BiCl₃ no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja (n = 6-8) para tratamento i.p. utilizando-se uma dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol. Estatisticamente diferente em comparação com o grupo controle. *P < 0,05.

A discrepância entre os resultados dos tratamentos *per os* e i.p. é decorrente de modelos de administração distintos. A administração *per os* compreende um grande número de variáveis, tais como taxa de dissolução dos compostos e o baixo pH do estômago. Considerando que estes fatores podem influenciar a absorção e biodisponibilidade dos compostos, eles podem ter sido responsáveis pela perda de atividade do lapachol no tratamento *per os*. Desta forma, os resultados sugerem que a coordenação ao bismuto(III) em 2 foi uma boa estratégia para melhorar o perfil antiangiogênico do lapachol após administração *per os*.

5.2.2 Medidas de Acumulação de Leucócitos

Componentes inflamatórios da inflamação crônica induzida por esponja foram determinados para os animais tratados com lapachol, [Bi(Lp)₂]Cl (2) e BiCl₃. O número de leucócitos nos implantes foi avaliado para os tratamentos *per os* (lapachol 25 mg/Kg/dia e 2,5 mg/Kg/dia) e i.p. (lapachol 25 mg/Kg/dia).

A infiltração de células mononucleares nos implantes foi quantificada através da presença da enzima *N*-acetilglicosaminidase (NAG), a qual está presente em grande quantidade em macrófagos ativados. Por sua vez, o número de neutrófilos nos implantes foi medido pela determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).^{21,22}

Após administração *per os* com lapachol 25 mg/Kg/dia e doses equivalentes de [Bi(Lp)₂]Cl e BiCl₃, a atividade de NAG foi inibida com relação ao grupo controle apenas pelo

²¹ J.B. Mendes, P.P. Campos, M.A. Rocha, S.P. Andrade, Life Sci. 84 (2009) 537.

²² M.A. Ferreira, L.S. Barcelos, P.P. Campos, A.C. Vasconcelos, M.M. Teixeira, S.P. Andrades, Br. J. Pharmacol. 141 (2004) 1185.

complexo de bismuto(III). Por outro lado, a atividade de NAG no tratamento i.p. (lapachol 25 mg/Kg/dia) foi estatisticamente diminuída nos animais tratados com lapachol e $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$, indicando um efeito nesta população de células inflamatórias. Estes resultados concordam com a redução de neovascularização, onde a coordenação do lapachol ao bismuto(III) melhorou a atividade do lapachol na administração *per os*.

Após tratamento *per os* utilizando lapachol 2,5 mg/Kg/dia e doses equivalentes dos demais compostos, nenhuma diferença estatística foi observada entre a atividade de NAG dos grupos tratados e do grupo controle. Então, neste caso, $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ não é capaz de interferir no recrutamento de macrófagos.

Em ambos os tratamentos, *per os* e i.p., atividade de MPO nos implantes não foi reduzida, sugerindo que os compostos estudados são incapazes de reduzir recrutamento/ativação de neutrófilos neste modelo de angiogênese inflamatória.

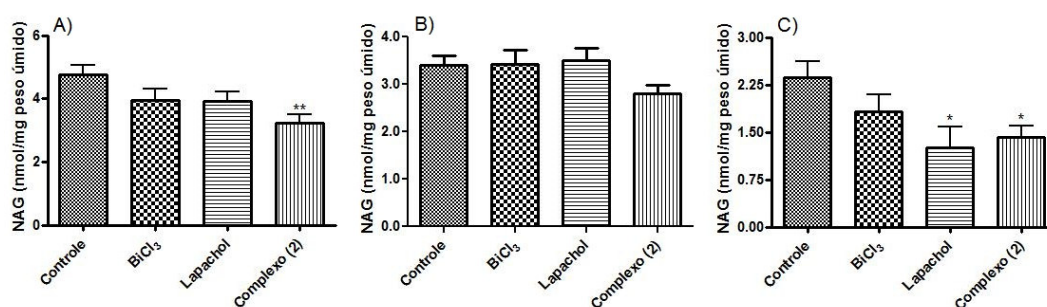


Figura 5.7. Efeitos na acumulação de macrófagos induzidos pelo lapachol, seu complexo de bismuto(III) e o sal BiCl_3 no modelo de angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja ($n = 8-13$). A) Tratamento *per os* com dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia; B) Tratamento *per os* com dose de lapachol igual a 2,5 mg/Kg/dia; C) Tratamento i.p. com dose de lapachol igual a 25 mg/Kg/dia. Doses dos demais compostos equivalentes à dose de lapachol. Estatisticamente diferente em comparação com o grupo controle. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

5.2.3 Análise Histológica

Nenhum sinal de infecção ou rejeição foi observado no local do implante ou na incisão durante o período de nove dias do experimento.

A análise histológica (Figura 5.8) mostrou que o procedimento utilizado na avaliação da atividade antiangiogênica induziu uma resposta fibrovascular, causando a formação de novos tecidos na esponja sintética.

Os implantes retirados do grupo controle apresentaram um denso infiltrado inflamatório com vários tipos de células, tais como leucócitos e microvasos. Nos grupos tratados com o lapachol e seu complexo de bismuto(III), a vascularização e a quantidade de células

inflamatórias diminuíram, conforme esperado, para compostos com propriedades antiangiogênicas e anti-inflamatórias.

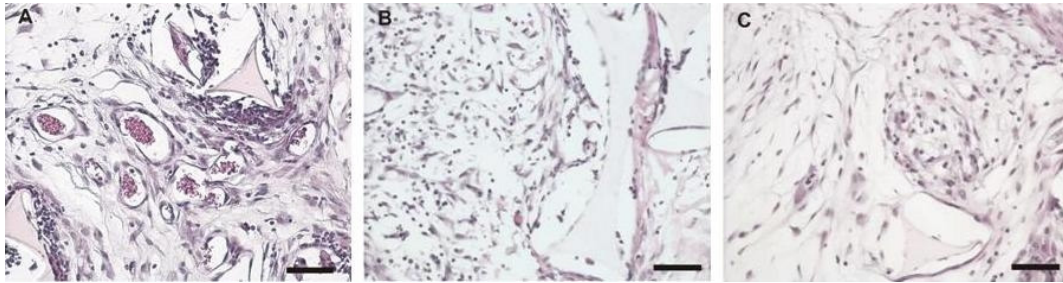


Figura 5.8. Corte histológico representativo de tecido fibrovascular induzido em implante de esponja em camundongos suíços após 9 dias de implantação. Formação de tecidos A) no implante do grupo controle; B) no implante do grupo tratado com lapachol C) no implante do grupo tratado com complexo de bismuto(III). A barra correspondente a 100 μm .

Capítulo 6. Complexos de antimônio(III) e estanho(IV) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina N(4)-orto-fenil-substituídas: avaliação das atividades antiparasitárias e antifúngicas

O principal uso clínico de compostos de antimônio ocorre no tratamento de *Leishmanioses*.¹ No entanto, os compostos de antimônio em uso clínico apresentam efeitos colaterais e, em alguns casos, verifica-se ainda o surgimento de resistência, o que estimula o desenvolvimento de novos compostos para a terapia desta doença.²

Atualmente, o potencial terapêutico dos antimoniais tem sido mais amplamente investigado. A atividade citotóxica de compostos de antimônio foi demonstrada para diversas linhagens de células tumorais.^{1,3} Além disso, estudos demonstram que compostos de antimônio também apresentam atividade antimicrobiana.^{4,5} Por sua vez, tanto *Leishmania* quanto *Trypanossoma* apresentam similaridades bioquímicas,⁶ o que justifica o estudo da atividade anti-*Trypanossoma* de antimoniais.

Complexos organoestânicos têm despertado muito interesse devido às suas aplicações farmacológicas como agentes antitumorais⁷, antimicrobianos⁸ e biocidas⁹. No entanto, estes complexos frequentemente apresentam elevada toxicidade,^{10,11} justificando a busca por novos compostos.

Conforme mencionado no capítulo de Introdução, tiossemicarbazonas apresentam uma grande diversidade de bioatividades.¹² Tendo em vista que as atividades biológicas apresentadas pelas tiossemicarbazonas são atribuídas às suas habilidades para formar quelatos com íons metálicos,¹³ parece-nos interessante a obtenção de complexos de tiossemicarbazonas com antimônio e estanho. A coordenação das tiossemicarbazonas aos centros metálicos pode

¹ E.R.T. Tiekink, Crit. Rev. Oncol. Hemat. 42 (2002) 217.

² J. Duffin, B.G. Campling, J. Hist. Med. All. Sci. 57 (2002) 61.

³ S. Wyllie, A.H. Fairlamb, Biochem. Pharmacol. 71 (2006) 257.

⁴ H.P.S. Chauhan, A. Bakshi, S. Bhatiya, Spectrochim. Acta A, Artigo *in Press*.

⁵ N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomyia, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176.

⁶ F.R. Opperdoes, J.-P. Szikora, Mol. Biochem. Parasitol. 147 (2006) 193.

⁷ P. Yang, M. Guo, Coord. Chem. Rev. 185-186 (1999) 189.

⁸ 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.

⁹ L. Pellerito, L. Nagy, Coord. Chem. Rev. 224 (2002) 111.

¹⁰ I.C. Mendes, F.B. Costa, G.M. De Lima, J.D. Ardisson, I. Garcia-Santos, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 1179.

¹¹ A.H. Jacobson, G.L. Willingham, Sci. Total Environ. 258 (2000) 103.

¹² H. Beraldo, D. Gambino, Mini-Ver. Med. Chem. 4 (2004) 159.

¹³ N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomyia, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176.

promover um aumento nas propriedades terapêuticas de ambos (ligante e metal), funcionando como uma boa estratégia para a busca de potenciais fármacos.¹⁴

Neste capítulo são apresentadas as caracterizações dos complexos de antimônio(III) e estanho(IV) obtidos a partir de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas *N*(4)-*orto*-fenil-substituídas. O substituinte fenila em *N*(4) confere maior caráter lipofílico às tiossemicarbazonas em comparação com os derivados não-substituído. Os complexos de antimônio(III) tiveram suas atividades anti-*Leishmania* e antichagásica investigadas, enquanto os complexos de estanho(IV) foram estudados contra diferentes cepas de fungos. Em todos os casos, estudos SAR foram realizados para averiguar a influência de algumas propriedades físico-químicas dos compostos nas suas atividades farmacológicas.

Os estudos da atividade antichagásica dos complexos de antimônio(III) encontram-se publicados na revista *Polyhedron*. A investigação da atividade antifúngica dos complexos de estanho(IV) foi publicada em *European Journal of Medicinal Chemistry* (ver Anexo).

6.1. Caracterização de 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-X-fenil tiossemicarbazonas (X = F e NO₂)

2-Acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofenil tiossemicarbazona (H₂Ac4oCℓPh), seus análogos *N*(4)-*orto*-fluorofenil- (H₂Ac4oFPh) e *N*(4)-*orto*-nitrofenil-substituídos (H₂Ac4oNO₂Ph), assim como 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofenil tiossemicarbazona (H₂Bz4oCℓPh) já encontram-se na literatura^{15,16} e, por isso, seus dados serão apresentados apenas quando necessário para comparação com os seus respectivos complexos. 2-Benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-fluorofenil tiossemicarbazona (H₂Bz4oFPh) e 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofenil tiossemicarbazona (H₂Bz4oNO₂Ph) são inéditas e os resultados das suas caracterizações são apresentados a seguir.

A Tabela 6.1 apresenta os rendimentos das reações, cores, temperaturas de fusão e massa molar das tiossemicarbazonas H₂Bz4oFPh e H₂Bz4oNO₂Ph.

¹⁴ A. Perez-Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. De Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C. L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467.

¹⁵ D.X. West, N.M. Kozub, G.A. Bain, *Transit. Metal Chem.* 21 (1996) 52.

¹⁶ D.L. Klayman, J.F. Bartosevich, T.S. Griffin, C.J. Mason, J.P. Scovill, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 855.

Tabela 6.1 Cores, temperaturas de fusão, massa molar (MM) e rendimentos de reação para H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph

Composto	Cor	Ponto de fusão (°C)	MM (g mol ⁻¹)	Rendimento (%)
H2Bz4oFPh	Amarelo	156,0-158,0	350,41	67
H2Bz4oNO ₂ Ph	Amarelo	155,2-155,8	377,42	89

6.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph foram obtidos em DMSO-*d*₆. A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das tiossemicarbazonas é apresentada na Figura 6.1. Os sinais e atribuições dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135 estão descritos nas Tabelas 6.2 e 6.3.

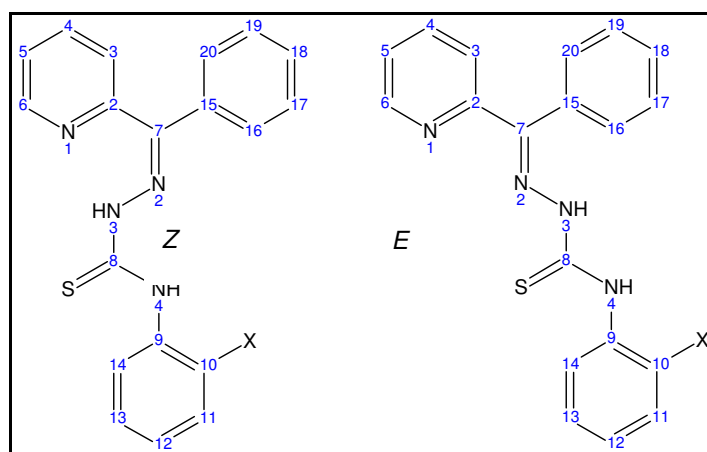


Figura 6.1. Estrutura genérica dos isômeros configuracionais *Z* e *E* das tiossemicarbazonas *N*(4)-*o*-substituídas e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

Os espectros de RMN de ¹H obtidos para as tiossemicarbazonas apresentaram sinais de hidrogênio duplicados, provenientes da presença dos isômeros configuracionais *Z* e *E*, conforme observado no espectro de H2Bz4oNO₂Ph (Figura 6.2). A coexistência dos isômeros configuracionais é comumente verificada nas tiossemicarbazonas.^{17,18} Os sinais de N(3)-H referentes ao isômero *Z* aparecem em frequências maiores que aqueles observados para o isômero *E*. Este comportamento é devido à ligação de hidrogênio existente no isômero *Z* entre N(3)-H e o nitrogênio piridínico.^{17,18} Desta forma, verifica-se que a espécie majoritária das

¹⁷ J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Da Silva, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5671.

¹⁸ 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.

tiossemicarbazonas é o isômero Z (N(3)-H em 13,26 e 13,51 ppm), representando 80 % para H2Bz4oFPh e 85 % para H2Bz4oNO₂Ph.

Nos espectros de RMN de ¹³C não foi possível observar a coexistência dos isômeros, devido à baixa solubilidade das tiossemicarbazonas.

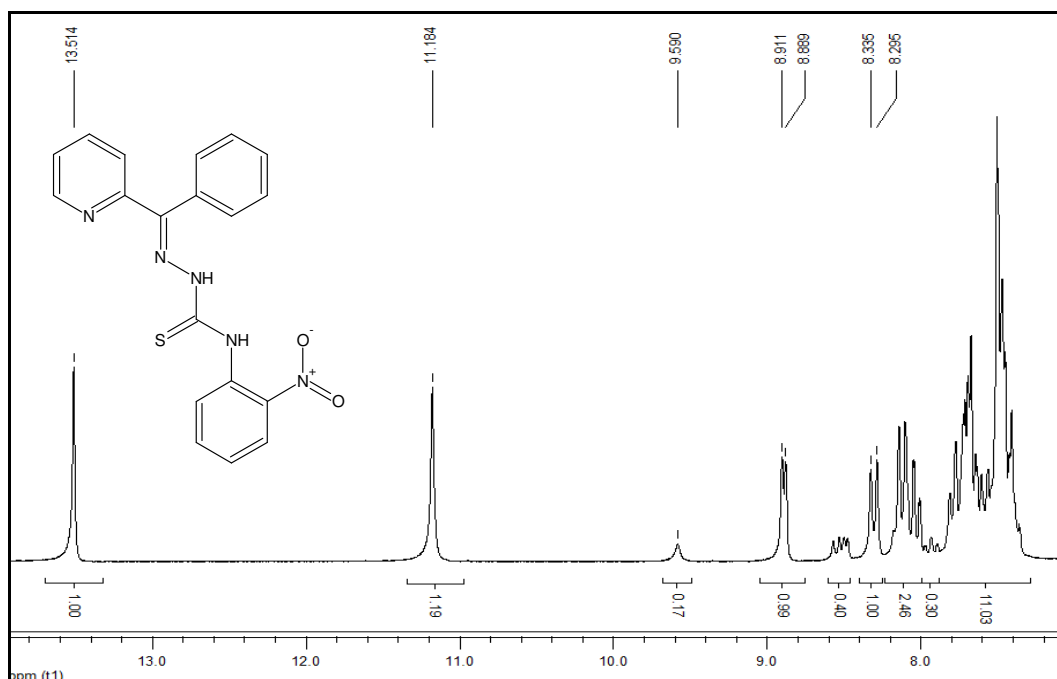


Figura 6.2. Espectro de RMN de ¹H da tiossemicarbazona H2Bz4oNO₂Ph obtido em DMSO-*d*₆.

Tabela 6.2. Atribuições, número de hidrogênios e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph

Atribuição	Nº de H	δ (ppm) H2Bz4oFPh		δ (ppm) H2Bz4oNO ₂ Ph	
		Z	E	Z	E
N3-H	1	13,26	10,46	13,51	--
N4-H	1	10,24	9,22	11,18	9,59
H3	1	7,71	--	8,32	8,50
H4	1	8,04	7,91	7,78	--
H5	1	7,59-7,65	--	8,05	--
H6	1	8,88	8,48	8,90	8,56

No espectro de RMN de ^{13}C de H2Bz4oFPh, apresentado na Figura 6.3, verifica-se a duplicidade dos sinais referentes aos carbonos C9-C14. Este comportamento ocorre devido ao acoplamento com ^{19}F ($I = 1/2$) e é observado para outros compostos contendo flúor.¹⁹

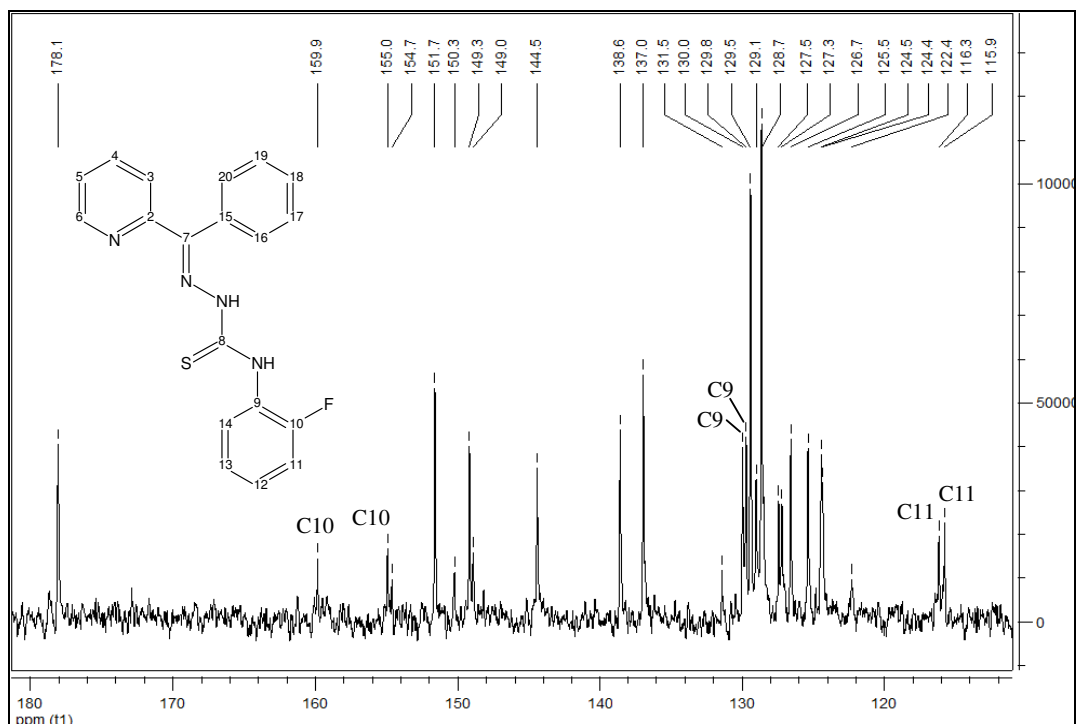


Figura 6.3. Espectro de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona H2Bz4oFPh obtido em DMSO- d_6 .

Tabela 6.3. Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph

Atribuição	DEPT	δ (ppm) H2Bz4oFPh	δ (ppm) H2Bz4oNO ₂ Ph
C2	---	151,18	151,08
C3	↑	124,96	124,99
C4	↑	138,12	138,21
C5	↑	126,17	125,16
C6	↑	148,76	148,78
C7	---	144,01	144,54
C8	---	177,58	176,20

¹⁹ R. Silverstein, F. Webster, Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. Ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.

6.1.2 Espectroscopia de Infravermelho

As atribuições das principais bandas de infravermelho das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph estão presentes na Tabela 6.4.

As bandas referentes ao estiramento $\nu(\text{N-H})$ são observadas em 3311 cm^{-1} para H2Bz4oFPh e 3267 cm^{-1} para H2Bz4oNO₂Ph. As absorções em 1618 e 1606 cm^{-1} são atribuídas ao modo $\nu(\text{C=N})$ das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph, respectivamente, enquanto as vibrações $\nu(\text{C=S})$ estão localizadas em 784 e 797 cm^{-1} . As bandas presentes em 614 cm^{-1} (para H2Bz4oFPh) e 630 cm^{-1} (para H2Bz4oNO₂Ph) são atribuídas à deformação no plano do anel piridínico.¹⁹

Tabela 6.4. Atribuição das principais bandas de infravermelho das tiossemicarbazonas H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph, dadas em cm^{-1}

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=S})$	$\rho(\text{py})$
H2Bz4oFPh	3311	1618	784	614
H2Bz4oNO ₂ Ph	3267	1606	797	630

6.1.3 Cristalografia de Raios X

Monocristais da tiossemicarbazona H2Bz4oNO₂Ph foram obtidos a partir de solução de DMSO-*d*₆, os quais foram adequados para a obtenção da sua estrutura cristalográfica.

Os dados cristalográficos foram coletados no difratômetro Xcalibur Atlas *GEMINI*, à temperatura ambiente (293 K). Os resumos da coleção de dados e do refinamento^{20,21,22,23} da estrutura estão dispostos na Tabela 6.5.

A estrutura determinada é apresentada na Figura 6.4, enquanto comprimentos e ângulos de ligação selecionados encontram-se na Tabela 6.6. Os principais comprimentos e ângulos de ligação de 2-benzoilpiridina-*N*(4)-fenil tiossemicarbazona (H2Bz4Ph)²⁴ também são apresentados na Tabela 6.6 para uma avaliação da influência do substituinte NO₂ na estrutura da molécula. A Tabela 6.7 apresenta os ângulos e distâncias das ligações de hidrogênio presentes na estrutura de H2Bz4oNO₂Ph.

²⁰ CRYCALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.33.55 (05-01-2010 CrysAlis171.NET).

²¹ R.C. Clark, J.S. Reid, Acta Crystallogr. A 51 (1995) 887.

²² G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for the solution of crystal structures. University of Göttingen, Germany, 1997.

²³ G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for crystal structure refinement. University of Göttingen, Germany, 1997.

²⁴ A.P. Rebolledo, G.M. De Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo, Appl. Organometal. Chem. 17 (2003) 945.

Tabela 6.5. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento da tiossemicarbazona H2Bz4oNO₂Ph

Composto	H2Bz4oNO ₂ Ph	
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₂ S	
Dimensões do cristal (mm)	0,87 x 0,14 x 0,11	
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	377.42	
Temperatura (K)	293(2)	
Comprimento de onda (Å)	0,71073	
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrômbico, Pbca	
Dimensões da célula unitária	a (Å)	10,8960(5)
	b (Å)	7,8158(3)
	c (Å)	41,9318(17)
	α; β; γ (°)	α = β = γ = 90
V (Å ³) / Z	3571,0(3) / 8	
F(000)	1568	
Densidade calc. (g cm ⁻³)	1,404	
μ (mm ⁻¹)	0,207	
Intervalo de θ (°)	2,22 – 26,37	
Intervalo de hkl	-13 ≤ h ≤ 13	
	-9 ≤ k ≤ 9	
	-52 ≤ l ≤ 52	
Máx. / mín. transmissão	0,980 / 0,911	
Correção de absorção	Analítica	
Reflexões medidas	31652	
Reflexões únicas / R _{int}	3630 / 0,0679	
Parâm. Ref. / restrições	244 / 0	
R (obs/all)	0,0465 / 0,0705	
wR (obs/all)	0,1083 / 0,1149	
S	1,056	
Δρ min/max (e Å ⁻³)	0,224 / -0,217	

H2Bz4oNO₂Ph cristaliza-se no sistema ortorrômbico e apresenta-se na forma do isômero configuracional Z, o qual é estabilizado pela ligação de hidrogênio N(3)-H(3)⋯N(1).

Uma ligação de hidrogênio fraca para N(4)-H(4A)···O(2) também encontra-se presente na estrutura da tiossemicarbazona.

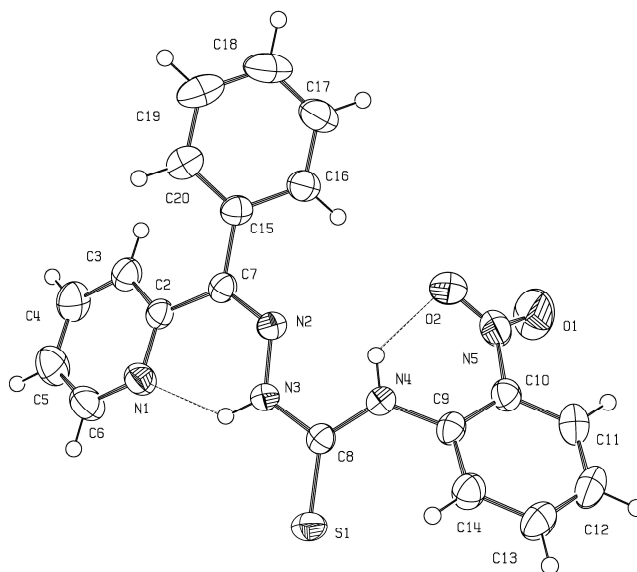


Figura 6.4. Diagrama ORTEP de H2Bz4oNO₂Ph, apresentando as ligações de hidrogênio intramoleculares existentes.

Conforme observado para outras tiossemicarbazonas,²⁵ H2Bz4oNO₂Ph apresenta o esqueleto C7-N2-N3-C8-S1-N4 quase planar, com desvio de 0,0378 Å com relação ao plano.

Comparando-se os dados estruturais de H2Bz4oNO₂Ph com os de H2Bz4Ph²⁴, verifica-se que o substituinte NO₂ não afeta os comprimentos de ligação do esqueleto da tiossemicarbazona (ver Tabela 6.6). As distâncias C(7)-N(2) e C(8)-S(1) são 1,296(2) e 1,663(2) Å em H2Bz4Ph e 1,297(3) e 1,660(2) Å em H2Bz4oNO₂Ph, respectivamente. O comprimento de ligação N(2)-N(3) varia de 1,362(2) Å em H2Bz4Ph para 1,358(2) Å em H2Bz4oNO₂Ph.

A presença do grupo nitro no anel fenílico também não interferiu consideravelmente nos ângulos do esqueleto da tiossemicarbazona. O ângulo C(7)-N(2)-N(3) varia de 119,4(2) ° em H2Bz4Ph para 120,52(18) ° em H2Bz4oNO₂Ph, enquanto N(2)-N(3)-C(8) muda de 120,5(2) ° em H2Bz4Ph para 120,09(17) ° em H2Bz4oNO₂Ph.

²⁵ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263.

Tabela 6.6. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados das tiossemicarbazonas H2Bz4Ph²⁴ e H2Bz4oNO₂Ph. Desvios padrão entre parênteses

Comprimentos de ligação	H2Bz4Ph ²⁴	H2Bz4oNO ₂ Ph	Ângulos	H2Bz4Ph ²⁴	H2Bz4oNO ₂ Ph
C(7)-N(2)	1,296(2)	1,297(3)	C(7)-N(2)-N(3)	119,4(2)	120,52(18)
N(2)-N(3)	1,362(2)	1,358(2)	N(2)-N(3)-C(8)	120,5(2)	120,09(17)
N(3)-C(8)	1,360(2)	1,364(3)	N(3)-C(8)-S(1)	117,7(1)	118,09(15)
C(8)-S(1)	1,663(2)	1,660(2)	N(3)-C(8)-N(4)	114,3(2)	113,31(17)
C(8)-N(4)	1,343(3)	1,353(3)	N(4)-C(8)-S(1)	128,0(1)	128,59(15)

Tabela 6.7. Distâncias de ligações de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para a tiossemicarbazona H2Bz4oNO₂Ph. Desvios padrão entre parênteses

Composto	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	(D-H...A)
H2Bz4oNO ₂ Ph	N(3)-H(3A)...N(1)	0,86	1,95	2,618(2)	133,1
	N(4)-H(4A)...O(2)	0,86	2,16	2,668(2)	117,6

6.2. Caracterização dos complexos de antimônio(III) de tiossemicarbazonas orto-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e avaliação das atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma*

Os complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**), [Sb(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**), [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂] (**5**) e [Sb(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**) foram obtidos através da reação entre SbCl₃ e a tiossemicarbazona desejada (ver seção 2.2.8).

6.2.1 Análises

Os rendimentos, pontos de fusão, massas molares, microanálises e condutividades molares dos complexos (**1-6**) são apresentados na Tabela 6.8.

As mudanças nos pontos de fusão dos complexos quando comparados com seus respectivos ligantes confirmam a presença de novos compostos. A pureza dos compostos foi confirmada por ressonância magnética nuclear, apresentada posteriormente (seção 6.2.2).

Tabela 6.8. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, massa molar e condutividade molar dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Composto	Rend. (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	MM (g mol ⁻¹)	Λ_M (cm ² Ω^{-1} mol ⁻¹)
[Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	94	241,9-245,0 (149,5-152,0)	33,85 (33,87)	2,39 (2,44)	11,19 (11,29)	496,46	13,02
[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	93	243,0-245,8 (165,2-166,2)	35,27 (35,03)	2,85 (2,52)	11,73 (11,67)	480,00	13,01
[Sb(2Ac4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (3)	98	242,7-242,9 (150,9-154,9)	33,20 (33,17)	2,31 (2,39)	13,74 (13,81)	507,01	11,25
[Sb(2Bz4oClPh)Cl ₂] (4)	62	214,8-217,5 (129,4-130,1)	40,95 (40,86)	2,53 (2,53)	9,98 (10,03)	558,53	11,45
[Sb(2Bz4oFPh)Cl ₂] (5)	72	210,4-212,5 (156,0-158,0)	41,03 (42,10)	2,58 (2,60)	10,45 (10,34)	542,07	9,68
[Sb(2Bz4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (6)	67	227,5-229,9 (155,2-155,8)	40,08 (40,10)	2,41 (2,48)	12,25 (12,31)	569,08	11,44

* Ponto de fusão dos respectivos ligantes entre parênteses; ** Valores teóricos entre parênteses.

Os resultados de análise elementar concordam com a formação de complexos do tipo [Sb(L)Cl₂], nos quais as tiossemicarbazonas encontram-se coordenadas ao metal na sua forma aniônica (L⁻), conforme Figura 6.5. Os baixos valores de condutividade molar destes complexos confirmam a ausência de contraíons,²⁶ indicando que os íons cloreto encontram-se coordenados ao antimônio(III).

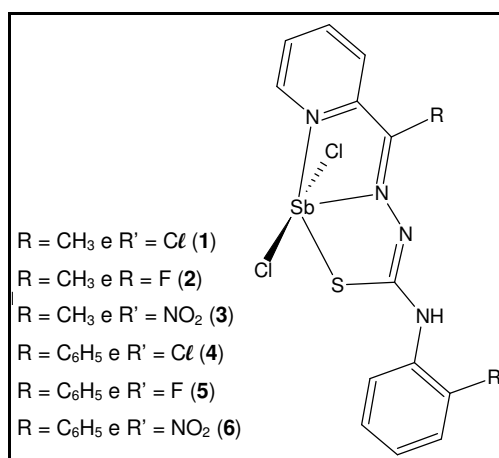


Figura 6.5. Estrutura genérica dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.

²⁶ W.J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os complexos $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**), $[\text{Sb}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), $[\text{Sb}(\text{2Bz4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**), $[\text{Sb}(\text{2Bz4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**5**) e $[\text{Sb}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**) foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY e HMQC, utilizando-se soluções de $\text{DMSO-}d_6$.

A numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes é apresentada na Figura 6.6 e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **1** e do seu ligante H2Ac4oClPh são apresentados nas Figuras 6.7 e 6.8. Os dados obtidos para os complexos são apresentados junto com os dos seus respectivos ligantes nas Tabelas 6.9 a 6.12.

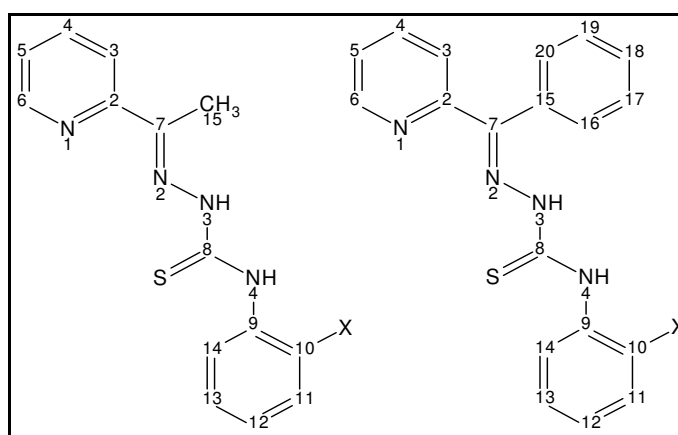


Figura 6.6. Numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes das tiossemicarbazonas *N*(4)-*ortho*-fenil-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina ($\text{X} = \text{Cl}$, F e NO_2).

Os espectros de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas livres apresentam sinais duplicados, decorrentes da presença de isômeros *Z* e *E*.^{17,18} Nos espectros das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, os sinais de N(3)-H em 14,68-14,84 e 10,90-11,18 ppm foram atribuídos aos isômeros *Z* (5-7 %) e *E* (93-95 %), respectivamente. Nos espectros das tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina, estes sinais foram encontrados entre 13,19 e 13,51 ppm para o isômero *Z* (79-85 %) e entre 10,44 e 10,53 ppm para o isômero *E* (15-21 %). Nos espectro de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas não foram observados sinais referentes aos isômeros minoritários, possivelmente devido à baixa solubilidade desses compostos em $\text{DMSO-}d_6$. Além disso, a baixa solubilidade de $\text{H2Ac4oNO}_2\text{Ph}$ impossibilitou a obtenção de seu espectro de RMN de ^{13}C .

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos complexos apresentam apenas um sinal para cada hidrogênio e cada carbono, indicando a presença de um único isômero.

Nos espectros de RMN de ^1H de todos os complexos verifica-se o desaparecimento do sinal referente ao hidrogênio N(3)-H, confirmando a desprotonação das tiossemicarbazonas ao coordenarem-se ao antimônio(III). Além disso, a coordenação das tiossemicarbazonas ao metal provoca deslocamentos nos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos da piridina, concordando com a coordenação do ligante através do nitrogênio piridínico. Os deslocamentos nos sinais referentes aos carbonos C7 e C8 nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos também sugerem o envolvimento do nitrogênio imínico e do enxofre na coordenação ao centro metálico. Desta forma, os resultados de RMN indicam que as tiossemicarbazonas coordenam-se pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$, apresentando configuração *E* quando complexadas ao antimônio(III).

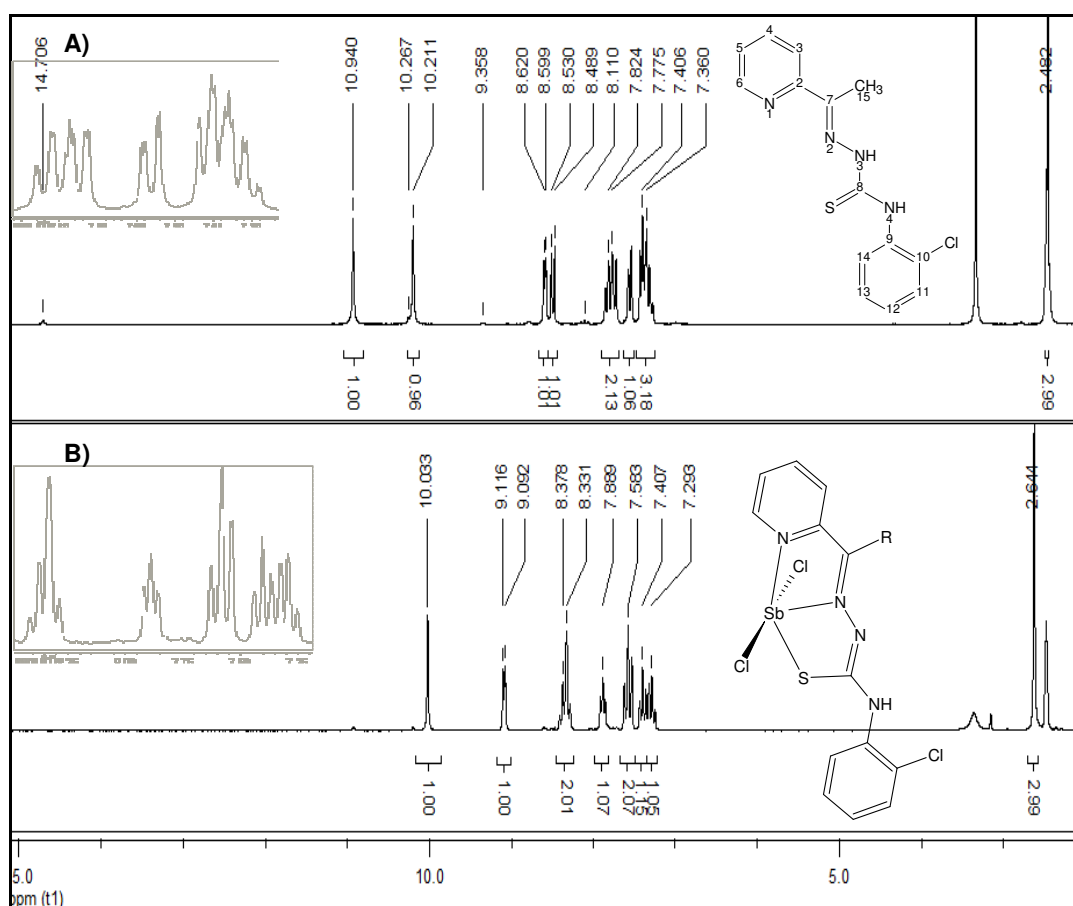


Figura 6.7. Espectros de RMN de ^1H A) do ligante $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ e B) do seu respectivo complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (1), obtido em $\text{DMSO-}d_6$.

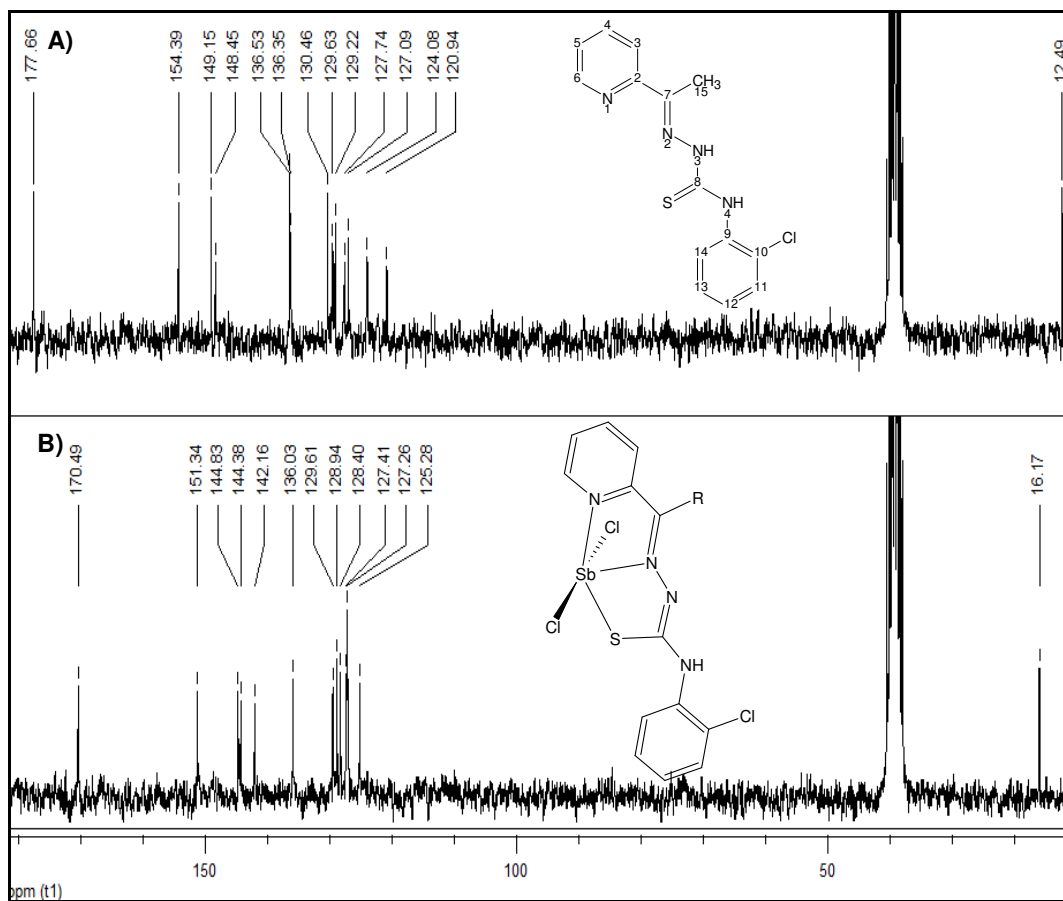


Figura 6.8. Espectros de RMN de ^{13}C A) do ligante H2Ac4oClPh e B) do seu respectivo complexo [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), obtido em DMSO-*d*₆.

Tabela 6.9. Atribuições (A), número de hidrogênio (N^o) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO-*d*₆)

A	N ^o	H2Ac4oClPh		1	H2Ac4oFPh		2	H2Ac4oNO ₂ Ph		3
		Z	E		Z	E		Z	E	
N3-H	1	14,71	10,94	--	14,68	10,90	--	14,84	11,18	--
N4-H	1	10,27	10,21	10,04	10,16	10,07	10,11	--	11,04	10,50
H3	1	--	8,51	8,42-8,29	8,80	8,55	8,37-8,31	--	8,46	8,40-8,36
H4	1	8,11	7,82	8,42-8,29	8,12	7,81	8,37-8,31	--	7,85	8,40-8,36
H5	1	--	7,44-7,28	7,89	--	7,50-7,35	7,89	--	7,60-7,35	7,91
H6	1	8,80	8,62	9,11	9,64	8,61	9,11	8,83	8,63	9,14
H15	3	--	2,48	2,65	--	2,47	2,68	--	2,50	2,62

Tabela 6.10. Atribuições (A), número de hidrogênio (N°) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes ($\text{DMSO-}d_6$)

A	N°	H2Bz4oCℓPh		4	H2Bz4oFPh		5	H2Bz4oNO ₂ Ph		6
		Z	E		Z	E		Z	E	
N3-H	1	13,19	10,53	--	13,26	10,46	--	13,51	--	--
N4-H	1	10,34	9,21	9,84	10,24	9,22	10,01	11,18	9,59	10,29
H3	1	8,47	--	7,43	7,71	--	7,47	8,32	8,50	7,96-7,92
H4	1	8,05	7,90	8,23	8,04	7,91	8,25	7,78	--	8,26
H5	1	8,21	--	7,88	7,59-7,65	--	7,89	8,05	--	7,91
H6	1	8,89	8,66	9,20	8,88	8,48	9,21	8,90	8,56	9,27

Tabela 6.11. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes ($\text{DMSO-}d_6$)

Atribuição	DEPT	H2Ac4oCℓPh	1	H2Ac4oFPh	2	3
C2	--	154,39	151,37	154,37	151,70	153,22
C3	↑	120,93	125,32	121,04	125,41	125,65
C4	↑	136,53	142,20	136,25	142,21	142,27
C5	↑	124,08	127,46	124,04	127,40	127,69
C6	↑	148,45	144,42	148,39	144,46	144,58
C7	--	149,15	144,86	149,24	144,86	144,74
C8	--	177,66	170,51	178,33	169,92	168,97
C15	--	12,49	16,19	12,42	16,32	16,30

Tabela 6.12. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes ($\text{DMSO-}d_6$)

Atribuição	DEPT	H2Bz4oCℓPh	4	H2Bz4oFPh	5	H2Bz4oNO ₂ Ph	6
C2	--	153,09	150,62	151,18	151,08	151,08	153,30
C3	↑	121,73	126,68	124,96	125,89	124,99	125,22
C4	↑	136,52	141,99	138,12	141,96	138,21	142,09
C5	↑	124,17	126,82	126,17	126,86	125,16	127,72
C6	↑	148,57	145,15	148,76	145,20	148,78	145,60
C7	--	147,03	145,07	144,01	145,03	144,54	145,00
C8	--	177,29	170,46	177,58	169,71	176,20	168,97

6.2.3 Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho dos complexos (1-6) e suas respectivas tiossemicarbazonas foram obtidos para a região de 4000 a 400 cm^{-1} em pastilhas de KBr e para a região de 710 a 200 cm^{-1} em nujol. As bandas mais úteis para a determinação do modo de coordenação da tiossemicarbazona ao metal estão presentes na Tabela 6.13.

Tabela 6.13. Atribuição das principais bandas de infravermelho dos complexos de antimônio(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes, dadas em cm^{-1}

Composto	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{SbN})$	$\nu(\text{SbS})$	$\nu(\text{SbCl})$	$\nu(\text{SbN}_{\text{py}})$
H2Ac4oClPh	1582	783	621	---	---	---	---
[Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	1597	753	642	448	360	321	229
H2Ac4oFPh	1615	784	620	---	---	---	---
[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	1612	753	643	457	427	324	241
H2Ac4oNO ₂ Ph	1608	782	621	---	---	---	---
[Sb(2Ac4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (3)	1604	741	639	447	340	323	236
H2Bz4oClPh	1593	798	614	---	---	---	---
[Sb(2Bz4oClPh)Cl ₂] (4)	1586	752	644	472	334	308	224
H2Bz4oFPh	1618	801	614	---	---	---	---
[Sb(2Bz4oFPh)Cl ₂] (5)	1615	760	641	474	337	318	220
H2Bz4oNO ₂ Ph	1606	797	630	---	---	---	---
[Sb(2Bz4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (6)	1605	741	640	470	341	307	220

Com a complexação, ocorre o deslocamento da banda referente ao estiramento $\nu(\text{CN})$, sugerindo que as tiossemicarbazonas coordenam-se ao metal pelo nitrogênio imínico. Além disso, verifica-se que o modo $\nu(\text{CS})$ presente nas tiossemicarbazonas livres em 782-801 cm^{-1} desloca-se para regiões de menor energia, sendo que os valores de deslocamento observados (30 a 56 cm^{-1}) indicam a mudança de enxofre da forma tiona para enxofre na forma de tiolato.^{27,28} As bandas atribuídas à deformação no plano da piridina são deslocadas para regiões de maior

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.

²⁸ 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.

energia quando comparadas com as bandas das tiossemicarbazonas livres. Isto está de acordo com a coordenação pelo nitrogênio piridídico.

Novas bandas são observadas nos espectros dos complexos nas regiões 447-474, 334-427 e 220-241 cm^{-1} , as quais são atribuídas aos modos $\nu(\text{Sb-N})$, $\nu(\text{Sb-S})$ e $\nu(\text{Sb-N}_{\text{py}})$, respectivamente. Estas bandas confirmam a coordenação das tiossemicarbazonas pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$.^{27,28} O aparecimento de bandas em 307-324 cm^{-1} nos complexos é justificado pelo estiramento $\nu(\text{Sb-Cl})$, comprovando a coordenação dos íons cloreto ao metal,^{27,28} conforme sugerido pelos resultados de microanálises e condutividade molar.

6.2.4 Cristalografia de Raios X

Monocristais adequados para difração de raios X foram obtidos a partir de solução de DMSO para os complexos $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**) e $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**).

Os dados cristalográficos foram coletados no difratômetro Oxford-Diffraction *GEMINI*, à temperatura ambiente (293 K). Os resumos da coleção de dados e do refinamento^{22,23,29} das estruturas estão dispostos na Tabela 6.14. As estruturas dos complexos são apresentadas na Figura 6.9 como diagramas ORTEP.^{30,31} Comprimentos e ângulos de ligação encontram-se nas Tabelas 6.15 e 6.16, respectivamente.

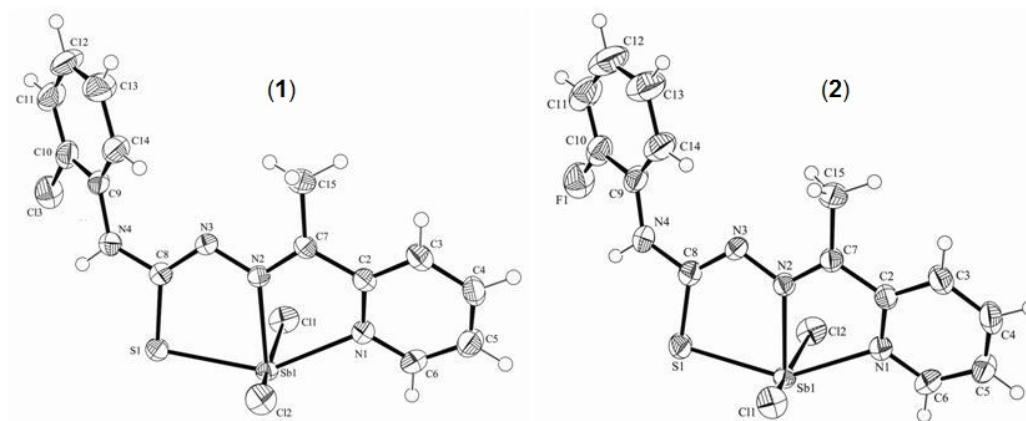


Figura 6.9. Diagramas ORTEP dos complexos $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**) e $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**).

²⁹ CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK scaling algorithm. CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.

³⁰ L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.

³¹ L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837.

Tabela 6.14. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento dos complexos [Sb(2Ac4oCℓPh)Cl₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (2)

Composto	[Sb(2Ac4oCℓPh)Cl ₂] (1)	[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₃ N ₄ SSb	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ FN ₄ SSb
Dimensões do cristal (mm)	0,26 x 0,22 x 0,20	0,32 x 0,32 x 0,20
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	496,44	479,99
Temperatura (K)	293(2)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrômico, Pbc _a	Ortorrômico, Pbc _a
a (Å)	8,1260(2)	8,1613(3)
Dimensões da célula unitária b (Å)	14,9117(3)	14,9096(6)
c (Å)	29,3376(8)	28,4736(10)
α; β; γ (°)	α = β = γ = 90	α = β = γ = 90
V (Å ³) / Z	3554,91(15) / 8	3464,7(2) / 8
F(000)	1936	1872
Densidade calc. (g cm ⁻³)	1,855	1,840
μ (mm ⁻¹)	2,123	2,033
Intervalo de θ (°)	2,78 – 26,37	2,82 – 26,37
	-7 ≤ h ≤ 10	-10 ≤ h ≤ 8
Intervalo de hkl	-18 ≤ k ≤ 18	-18 ≤ k ≤ 17
	-35 ≤ l ≤ 36	-35 ≤ l ≤ 35
Reflexões medidas	14228	15223
Reflexões únicas / R _{int}	3634 / 0,0361	3542 / 0,0275
Parâm. Ref. / restrições	210 / 0	209 / 0
R (obs/all)	0,0267 / 0,0375	0,0283 / 0,0373
wR (obs/all)	0,0629 / 0,0693	0,0599 / 0,0618
S	1,074	1,098
Δρ min/max (e Å ⁻³)	0,957 / -0,699	0,505 / -1,129

As estruturas obtidas para os complexos **(1)** e **(2)** revelam que as tiossemicarbazonas coordenam-se ao centro metálico na forma *E*, conforme verificado por RMN de ^1H . Além disso, os dados cristalográficos destes complexos indicam que eles são compostos neutros e apresentam o ambiente de coordenação ao Sb(III) como N_2SCL_2 .

Apesar de o antimônio encontrar-se pentacoordenado em ambos os complexos, a presença do par de elétrons não ligantes deste íon faz com que a geometria dos compostos seja descrita como *pseudo*-octaédrica. Este comportamento já foi verificado na literatura¹³ e por outros membros do nosso grupo de pesquisa.^{27,28}

Nos complexos **(1)** e **(2)**, o íon Sb(III) encontra-se no plano central formado pelos átomos N(1), N(2) e S(1), enquanto os cloretos estão dispostos *trans* um ao outro, apresentado um ângulo $\text{Cl}(1)\text{-Sb}(1)\text{-Cl}(2)$ de $162,67(3)^\circ$ para **1** e $162,59(3)^\circ$ para **2**. A distorção deste ângulo em relação ao de octaedro perfeito pode ser atribuída à existência do par de elétrons não ligante do antimônio. Distorções da geometria octaédrica também são observadas nos demais ângulos formados com o átomo central. No entanto, as maiores variações são observadas para os ângulos formados pelos átomos N(1)-Sb(1)-N(2) e N(2)-Sb(1)-S(1), os quais são menores que 80° . Estas distorções são decorrentes da tensão dos anéis de cinco membros formados pela tiossemicarbazona com o Sb(III).

Os comprimentos da ligação C(8)-S(1) verificados para **1** ($1,745(3) \text{ \AA}$) e **2** ($1,738(4) \text{ \AA}$) são condizentes com a coordenação através da forma tiolato do ligante.^{27,28} Além disso, as distâncias N(3)-C(8) nos complexos são menores que àquelas geralmente observadas para as tiossemicarbazonas livres.^{17,32,33,34} Desta forma, observa-se que a coordenação provoca um alongamento da ligação C(8)-S(1), juntamente com o encurtamento da ligação N(3)-C(8) decorrente da desprotonação de N(3)-H. Isto é corroborado pela comparação dos comprimentos de ligação de **1** com os de sua respectiva tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ ¹⁷ (ver Tabela 6.14).

³² R. Venkatraman, H. Ameera, L. Sitole, E. Ellis, F. R. Fronczek, E. J. Valente, J. Chem. Crystallogr. 39 (2009) 711.

³³ A. Pérez-Rebolledo, 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.

³⁴ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571.

Tabela 6.15. Comprimentos de ligação (Å) selecionados da hidrazona H2Ac4oClPh¹⁷ e dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (2). Desvios padrão entre parênteses

Átomos	H2Ac4oClPh* ¹⁷		[Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)
C(7)-N(2)	1,281(3)	1,278(3)	1,229(4)	1,301(4)
C(8)-S(1)	1,654(3)	1,654(3)	1,745(3)	1,738(4)
C(8)-N(3)	1,359(3)	1,351(3)	1,301(4)	1,306(4)
C(8)-N(4)	1,328(4)	1,336(3)	1,350(4)	1,355(4)
N(2)-N(3)	1,362(3)	1,361(3)	1,365(3)	1,370(4)
Sb(1)-N(1)	---	---	2,367(3)	2,358(3)
Sb(1)-N(2)	---	---	2,238(2)	2,240(3)
Sb(1)-S(1)	---	---	2,5329(8)	2,5378(9)
Sb(1)-Cl(1)	---	---	2,5327(8)	2,6198(9)
Sb(1)-Cl(2)	---	---	2,6172(8)	2,5285(9)

* Presença de duas moléculas na unidade assimétrica

Tabela 6.16. Ângulos de ligação (°) selecionados da hidrazona H2Ac4oClPh¹⁷ e dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (1) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (2). Desvios padrão entre parênteses

Átomos	H2Ac4oClPh* ¹⁷		[Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)
N(1)-Sb(1)-N(2)	---	---	69,44(9)	69,31(9)
N(1)-Sb(1)-Cl(1)	---	---	83,21(7)	83,87(7)
N(1)-Sb(1)-Cl(2)	---	---	84,00(7)	82,56(7)
N(1)-Sb(1)-S(1)	---	---	145,91(7)	145,63(7)
N(2)-Sb(1)-Cl(1)	---	---	82,46(6)	81,89(7)
N(2)-Sb(1)-Cl(2)	---	---	82,12(6)	83,14(7)
N(2)-Sb(1)-S(1)	---	---	76,51(6)	76,42(7)
Cl(1)-Sb(1)-Cl(2)	---	---	162,67(3)	162,59(3)
Cl(1)-Sb(1)-S(1)	---	---	90,93(3)	94,04(3)
Cl(2)-Sb(1)-S(1)	---	---	93,13(3)	91,04(3)
C(7)-N(2)-N(3)	119,1(2)	118,7(2)	116,2(2)	115,7(3)
C(8)-N(3)-N(2)	118,2(2)	118,9(2)	116,4(4)	115,9(3)
N(3)-C(8)-N(4)	114,7(2)	114,4(2)	118,2(3)	117,4(3)
N(3)-C(8)-S(1)	121,0(2)	121,5(2)	126,9(2)	127,3(3)
N(4)-C(8)-S(1)	124,3(2)	124,1(2)	114,8(2)	115,2(3)

* Presença de duas moléculas na unidade assimétrica.

A Tabela 6.17 apresenta informações sobre as ligações de hidrogênio dos complexos. Os complexos **(1)** e **(2)** apresentam ligações de hidrogênio intermoleculares fracas, com ângulo N(4)-H(4A)···Cl(1) de 143,2 ° para **1** e ângulo N(4)-H(4A)···Cl(2) de 143,3 ° para **2**. Além disso, interações intermoleculares de curto alcance ocorrem entre o Sb(III) e o íon cloreto da molécula vizinha. Estas interações, juntamente com as ligações de hidrogênio N(4)-H···Cl, geram um arranjo tridimensional, conforme apresentado na Figura 6.10.

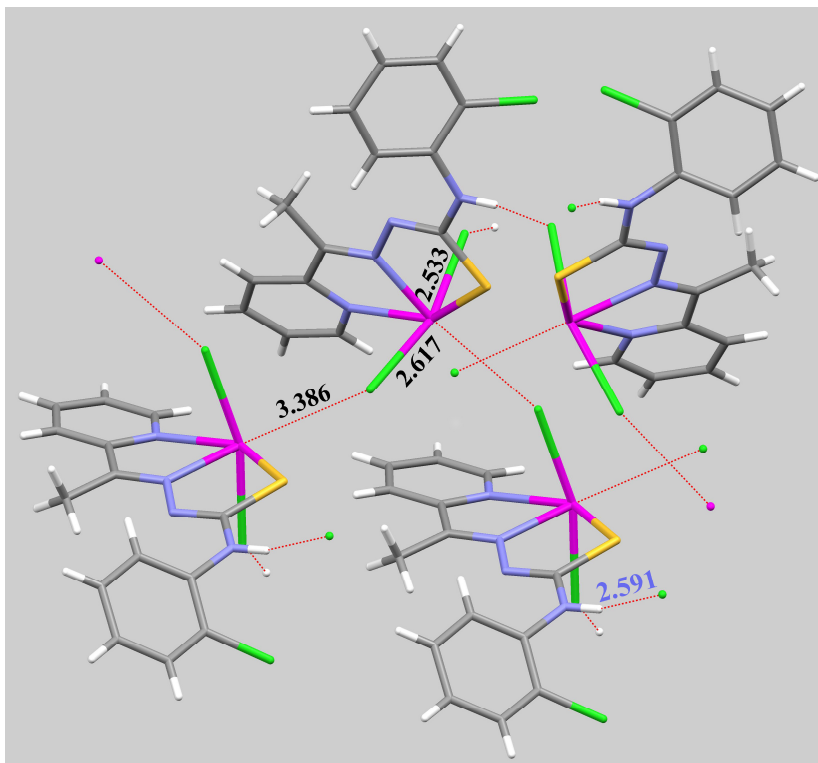


Figura 6.10. Empacotamento molecular do complexo [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**).

Tabela 6.17. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**) e [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**)

Composto	D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
[Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	N(4)-H(4A)···Cl(2) ⁱ	0,86	2,58	3,312	143,3
[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	N(4)-H(4A)···Cl(1) ⁱⁱ	0,86	2,59	3,320	143,2

Transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes: i: $-x+1/2, y-1/2, z$; ii: $3/2-x, 1/2+y, z$.

6.2.5 Atividade Anti-*Leishmania*

A atividade leishmanicida das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e de seus respectivos complexos de antimônio(III) foi avaliada frente a forma promastigota de *Leishmania major*.

A concentração dos compostos capaz de inibir o crescimento de *L. major* em 50 % (IC₅₀) foi determinada com o intuito de averiguar a potência dos compostos contra esta forma promastigota de *Leishmania* (ver Tabela 6.18). A eficácia leishmanicida dos compostos foi também avaliada considerando-se o efeito máximo, em porcentagem, que os compostos apresentaram no ensaio de viabilidade da forma promastigota de *L. major*.

O antimoniato de *N*-metil glucamina (Glucantime[®]), fármaco de primeira escolha usado no Brasil, e o leishmanicida pentamidina (Lomidina[®]) foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 6.18. Atividade e eficácia leishmanicida *in vitro* para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III) frente as formas promastigotas de *Leishmania major*

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Eficácia (%) ^a
H2Ac4oCℓPh	59,1	95,7 ± 0,8 **
[Sb(2Ac4oCℓPh)Cl ₂] (1)	44,2	98,9 ± 0,1 **
H2Ac4oFPh	19,4	97,9 ± 0,8 **
[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	8,5	94,3 ± 0,1 **
H2Ac4oNO ₂ Ph	18,0	55,6 ± 0,9 **
[Sb(2Ac4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (3)	> 100	45,2 ± 3,0 **
H2Bz4oCℓPh	6,1	73,8 ± 1,2 **
[Sb(2Bz4oCℓPh)Cl ₂] (4)	7,4	68,1 ± 0,6 **
H2Bz4oFPh	23,0	87,5 ± 1,5 **
[Sb(2Bz4oFPh)Cl ₂] (5)	28,7	86,6 ± 2,9 **
H2Bz4oNO ₂ Ph	21,3	88,2 ± 1,7 **
[Sb(2Bz4oNO ₂)Cl ₂] (6)	70,6	86,4 ± 0,4 **
Glucantime	> 100	22,9 ± 2,7
Pentamidina	0,8	72,6 ± 2,0 **
SbCl ₃	> 100	17,4 ± 8,5

^a Efeito máximo dos compostos no ensaio de viabilidade de *L. major*, em triplicata ± erro padrão. Os valores de eficácia máxima foram considerados significativos para *P < 0,05 e **P < 0,01, em relação ao grupo contendo DMSO 0,1 %.

Os resultados obtidos revelaram que os compostos testados, exceto SbCl_3 , apresentaram significativa atividade antipromastigota contra *L. major*. De forma geral, os complexos de antimônio(III) apresentaram eficácia máxima similar às verificadas para suas correspondentes tiossemicarbazonas. Observa-se ainda que a eficácia de todas as tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) é superior à do fármaco glucantime, sendo, em alguns casos, superior também à da pentamidina.

A coordenação das tiossemicarbazonas ao antimônio(III) resultou em um aumento significativo da atividade apenas no caso do ligante $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oFPh}$ ($\text{IC}_{50} = 19,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e seu complexo $[\text{Sb}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**) ($\text{IC}_{50} = 8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Além disso, o complexo (**2**) também encontra-se entre os compostos mais ativos, juntamente com a tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oClPh}$ ($\text{IC}_{50} = 6,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e seu complexo $[\text{Sb}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**) ($\text{IC}_{50} = 7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$).

A complexação não alterou a atividade leishmanicida das tiossemicarbazonas cloro-substituídas. Por outro lado, a atividade leishmanicida das tiossemicarbazonas contendo o substituinte nitro no anel fenílico ($\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oNO}_2\text{Ph}$ e $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oNO}_2\text{Ph}$) diminuiu após a coordenação ao antimônio(III), indicando que a complexação não foi uma boa estratégia para esta classe de compostos.

Os valores de IC_{50} das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio, exceto $[\text{Sb}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), foram inferiores ao valor de IC_{50} do glucantime. Por outro lado, a pentamidina apresentou atividade superior a todos os compostos testados, com IC_{50} de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, este fármaco apresenta sérios efeitos colaterais, limitando seu uso a pacientes hipersensíveis ao antimônio ou que não responderam ao fármaco de primeira escolha.^{35,36} Desta forma, apesar de os compostos serem menos ativos que a pentamidina, eles são terapeuticamente interessantes, com atividade leishmanicida superior ao fármaco padrão glucantime.

A citotoxicidade é um dos parâmetros biológicos mais comumente avaliado, após a determinação da atividade. Isto porque a citotoxicidade pode ser facilmente determinada, além de aderir ao paradigma dose-dependente de Paracelsus e prever o grau de toxicidade para a célula, indicando a real possibilidade de uso dos compostos avaliados.³⁷ Assim, uma investigação da citotoxicidade dos compostos foi realizada através do ensaio de liberação de

³⁵ S.S. Chauhan, L. Gupta, M. Mittal, P. Vishwakarma, S. Gupta, P.M.S. Chauhan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 6191.

³⁶ A. Bouhlef, C. Curti, A. Dumètre, M. Laget, M.D. Crozet, N. Azas, P. Vanelle, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 7310.

³⁷ M.-H. Cho, A. Niles, R. Huang, J. Inglese, C.P. Austin, T. Riss, M. Xia, *Toxicol. In Vitro* 22 (2008) 1099.

lactato desidrogenase (LDH), o qual é amplamente utilizado em estudos toxicológicos *in vitro*.³⁷ Neste estudo, concentrações de 10, 30 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram utilizadas para os compostos e os fármacos glutantime e pentadimina e os resultados são apresentados na Figura 6.11.

Conforme observado, nenhum dos compostos testados apresentou toxicidade na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os compostos H2Ac4oCℓPh, [Sb(2Ac4oCℓPh)Cl₂] (**1**) e H2Bz4oCℓPh apresentaram toxicidade na concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, quando comparados ao grupo controle, enquanto H2Ac4oFPh e [Sb(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**) induziram necrose em macrófagos peritoneais apenas na concentração máxima utilizada (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os demais compostos apresentam toxicidade superior a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Uma vez que H2Ac4oCℓPh e **1** foram citotóxicos em 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e apresentaram valores de IC₅₀ superiores a esta concentração, esses compostos não são considerados bons agentes leishmanicidas. Isto também acontece com o complexo (**3**), o qual apresentou um valor de IC₅₀ superior à sua citotoxicidade. Por outro lado, H2Ac4oFPh e H2Bz4oCℓPh possuem valores de IC₅₀ inferiores à concentração na qual estes compostos foram tóxicos. Porém, o índice terapêutico (IT) destes compostos (IT = toxicidade/IC₅₀) é ainda muito pequeno (IT = 5,15 para H2Ac4oFPh e IT = 4,94 para H2Bz4oCℓPh).

Assim, os melhores protótipos são aqueles que apresentam toxicidade superior a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, uma vez que estes apresentam maiores valores de IT. Dentre estes compostos, destacam-se os complexos [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**) (IT = 11,8) e [Sb(2Bz4oCℓPh)Cl₂] (**4**) (IT = 13,5), devido a alta atividade leishmanicida dos mesmos.

Com o intuito de avaliar a influência de algumas propriedades físico-químicas dos compostos na atividade leishmanicida, uma investigação da relação estrutura-atividade foi realizada para as tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III). Para este estudo, foram considerados o momento dipolo e as energias de HOMO de LUMO dos compostos. No entanto, nenhuma correlação foi obtida entre estas propriedades e a atividade leishmanicida das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III).

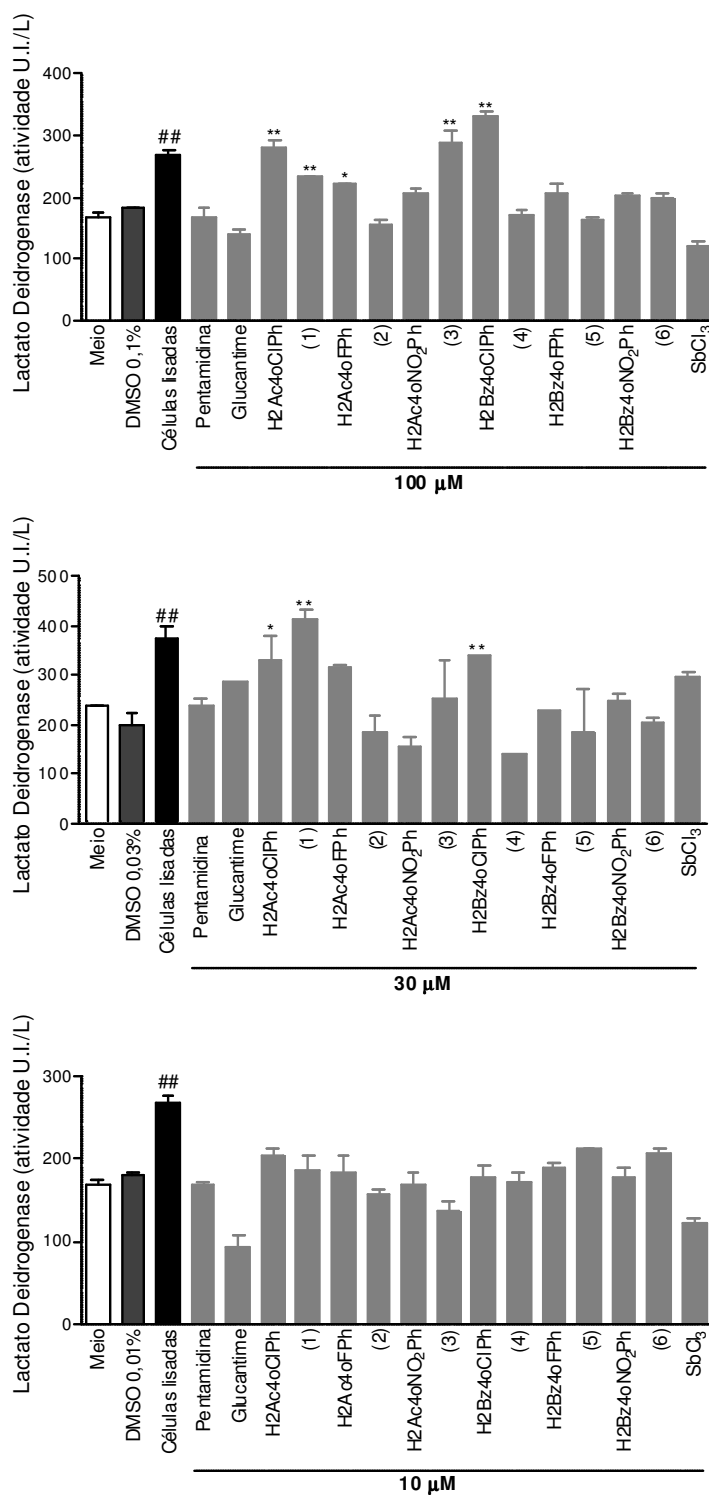


Figura 6.11. Avaliação da citotoxicidade das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzilpiridina e seus complexos de antimônio(III) nas concentrações de 10, 30 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no ensaio de viabilidade celular por medida de atividade de LDH. Testes realizados em triplicata. ## $P < 0,01$ em relação ao controle negativo (células cultivadas apenas com meio); * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo de células cultivadas com meio e veículo.

6.2.6 Atividade Anti-Trypanosoma

O efeito das tiossemicarbazonas e seus correspondentes complexos de antimônio(III) no crescimento da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* foi investigado com o intuito de avaliar a atividade antichagásica destes compostos. Nifurtimox foi utilizado como fármaco de referência e os valores de IC₅₀ para a forma epimastigota de *T. cruzi* são apresentados na Tabela 6.19.

Tabela 6.19. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* *in vitro* para tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III) frente a forma epimastigota (cepa Tulahuen 2)

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Citotoxicidade (μmol L ⁻¹)	Índice Terapêutico*
H2Ac4oCℓPh	0,310	3,28	10,58
[Sb(2Ac4oCℓPh)Cℓ ₂] (1)	0,140	2,01	14,36
H2Ac4oFPh	0,280	3,47	12,39
[Sb(2Ac4oFPh)Cℓ ₂] (2)	0,250	0,521	2,08
H2Ac4oNO ₂ Ph	0,410	317,1	773
[Sb(2Ac4oNO ₂ Ph)Cℓ ₂] (3)	0,440	0,493	1,12
H2Bz4oCℓPh	0,110	136,3	1239
[Sb(2Bz4oCℓPh)Cℓ ₂] (4)	0,110	1,79	16,27
H2Bz4oFPh	0,360	2,85	7,92
[Sb(2Bz4oFPh)Cℓ ₂] (5)	0,260	1,84	7,08
H2Bz4oNO ₂ Ph	0,430	2,65	6,16
[Sb(2Bz4oNO ₂ Ph)Cℓ ₂] (6)	0,490	1,76	3,59
SbCℓ ₃	4,850	21,9	4,52
Nifurtimox	7,700	3,48	0,45

* Índice terapêutico (IT) = Citotoxicidade/IC₅₀

As tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio foram altamente ativos contra a forma epimastigota de *T. cruzi* testada, apresentando atividade antichagásica superior ao nifurtimox. Além disso, os índices terapêuticos de todos os compostos também foram maiores que o do fármaco de referência utilizado.

Os resultados obtidos revelam que H2Bz4oCℓPh e os complexos (1) e (4) são os compostos mais ativos contra *T. cruzi*, inibindo o crescimento 55 a 70 vezes mais que o

nifurtimox. Além disso, H2Bz4oClPh possui um alto índice terapêutico, o que torna este composto um potencial agente antichagásico.

SbCl₃ apresentou uma baixa atividade anti-*Trypanosoma*. Por outro lado, a complexação com antimônio(III) mostrou-se interessante no caso dos complexos (1) e (5), os quais foram mais ativos que suas respectivas tiossemicarbazonas. A mudança mais notória foi verificada para o complexo (1), cuja coordenação melhorou em duas vezes a atividade antichagásica, além de aumentar o índice terapêutico.

Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa investigou a atividade anti-*Trypanosoma* de 2-formilpiridina-, 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina-*N*(4)-fenil tiossemicarbazonas (H2Fo4Ph, H2Ac4Ph e H2Bz4Ph, respectivamente) e seus complexos de antimônio frente epimastigotas de *T. cruzi*.²⁷ Visto que a cepa utilizada no estudo anterior (Y) é diferente da cepa utilizada neste trabalho (Tulahuen 2), não é possível realizar uma comparação das atividades antichagásicas dos compostos. Porém, os testes de citotoxicidade de ambos os trabalhos foram realizados da mesma forma, possibilitando compará-los.

Todas as hidrazonas não-substituídas e seus complexos de antimônio(III) apresentaram elevada citotoxicidade. H2Ac4Ph e seu complexo de antimônio(III) apresentaram valores de citotoxicidade inferiores a 1,0 μmol L⁻¹. Por sua vez, os valores de citotoxicidade de H2Bz4Ph e [Sb(Bz4Ph)Cl₂] foram inferiores a 3,0 e 1,9 μmol L⁻¹, respectivamente.²⁷ Desta forma, verifica-se que a presença dos substituintes na posição *orto* do anel fenílico foi uma estratégia interessante para diminuir a citotoxicidade e aumentar o índice terapêutico dos compostos.

6.2.7 Estudos de Relação Estrutura-Atividade (SAR)

Com o intuito de avaliar a influência de algumas propriedades físico-químicas dos compostos na atividade antichagásica e na citotoxicidade, uma investigação da relação estrutura-atividade foi realizada para as tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III).

Os parâmetros físico-químicos dos compostos são apresentados Tabela 6.20.

Tabela 6.20. Propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de antimônio(III)

Composto	ϵ (HOMO) (u.a.)*	ϵ (LUMO) (u.a.)	Momento dipolo
H2Ac4oCℓPh	-0,2035 (isômero <i>E</i>)	-0,0821 (isômero <i>E</i>)	3,120 (isômero <i>E</i>)
	-0,2033 (isômero <i>Z</i>)	-0,0704 (isômero <i>Z</i>)	5,700 (isômero <i>Z</i>)
H2Ac4oFPh	-0,2026 (isômero <i>E</i>)	-0,0583 (isômero <i>E</i>)	2,843 (isômero <i>E</i>)
	-0,2015 (isômero <i>Z</i>)	-0,0693 (isômero <i>Z</i>)	5,874 (isômero <i>Z</i>)
H2Ac4oNO ₂ Ph	-0,2101 (isômero <i>E</i>)	-0,1021 (isômero <i>E</i>)	0,513 (isômero <i>E</i>)
	-0,2091 (isômero <i>Z</i>)	-0,0891 (isômero <i>Z</i>)	4,279 (isômero <i>Z</i>)
H2Bz4oCℓPh	-0,2018 (isômero <i>E</i>)	-0,0614 (isômero <i>E</i>)	3,187 (isômero <i>E</i>)
	-0,2041 (isômero <i>Z</i>)	-0,0725 (isômero <i>Z</i>)	5,581 (isômero <i>Z</i>)
H2Bz4oFPh	-0,2010 (isômero <i>E</i>)	-0,0600 (isômero <i>E</i>)	3,440 (isômero <i>E</i>)
	-0,2024 (isômero <i>Z</i>)	-0,0715 (isômero <i>Z</i>)	5,588 (isômero <i>Z</i>)
H2Bz4oNO ₂ Ph	-0,2079 (isômero <i>E</i>)	-0,0987 (isômero <i>E</i>)	1,846 (isômero <i>E</i>)
	-0,1989 (isômero <i>Z</i>)	-0,0543 (isômero <i>Z</i>)	6,162 (isômero <i>Z</i>)
1	-0,2430	-0,1992	21,8899
2	-0,2452	-0,2020	22,750
3	-0,2450	-0,1967	20,692
4	-0,2380	-0,1968	21,008
5	-0,2385	-0,1956	23,334
6	-0,2407	-0,2002	22,336

* 1 u.a. = 27,211 eV; eV = 627,51 Kcal mol⁻¹

Para a obtenção de matrizes de correlação das tiossemicarbazonas, considerou-se a existência dos isômeros *Z* e *E*. Nenhuma correlação entre as propriedades físico-químicas e a atividade antichagásica das tiossemicarbazonas foi observada considerando-se os isômeros *E* e *Z* separadamente ou utilizando-se os isômeros majoritários (*E* para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e *Z* para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina). Correlações entre a atividade e as propriedades físico-químicas dos complexos também não foram verificadas. A falta de correlação pode ser decorrente, em parte, da pequena diferença nos valores de atividade antichagásica dos compostos estudados.

Uma vez que uma faixa mais ampla de valores foi verificada para a citotoxicidade, nós avaliamos a influência das propriedades físico-químicas no efeito citotóxico dos compostos.

Considerando-se apenas os isômeros *E* das tiossemicarbazonas verifica-se uma correlação direta entre o momento dipolo e a citotoxicidade, indicando que um aumento no momento dipolo pode acarretar uma maior citotoxicidade. Além disso, correlações diretas foram obtidas tanto com o momento dipolo quanto com as energias de HOMO e LUMO quando os isômeros *Z* foram considerados. Analisando-se as espécies majoritárias observadas nos espectros de RMN de ^1H (seção 6.2.2), correlações foram obtidas entre a citotoxicidade e as energias de HOMO e LUMO.

Uma matriz de correlação entre as propriedades físico-químicas dos complexos e seus valores de citotoxicidade também foi obtida. Os resultados revelaram uma correlação inversa entre a citotoxicidade e a energia de HOMO dos complexos. De fato, verifica-se que os complexos (2) e (3) são os mais citotóxicos e apresentam os menores valores de energia de HOMO.

6.3 Caracterização de complexos de estanho(IV) de tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e avaliação da atividade antifúngica

Reações entre as tiossemicarbazonas *orto*-substituídas e $\text{Sn}(n\text{-Bu})\text{Cl}_3$ deram como produtos os complexos organometálicos $[\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{ClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{FPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (8), $[\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{ClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10), $[\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{FPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (11) e $[\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{NO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12) (ver seção 2.2.9).

6.3.1 Análises

Os rendimentos, pontos de fusão, massas molares, microanálises e condutividades molares dos complexos são apresentados na Tabela 6.21.

Os valores de ponto de fusão obtidos para os complexos serviram como indicação inicial de que novos compostos foram formados.

Os resultados das microanálises sugerem a obtenção de complexos de estanho(IV) do tipo $[\text{Sn}(\text{L})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$, onde o ligante encontra-se na sua forma aniônica (L^-) (Figura 6.12). A desprotonação das tiossemicarbazonas quando coordenadas é corroborada pelos espectros de RMN de ^1H dos complexos, os quais serão discutidos posteriormente com mais detalhes. A coordenação dos íons cloreto ao centro metálico é confirmada pelos dados de condutividade molar que, segundo Geary,²⁶ referem-se a espécies neutras.

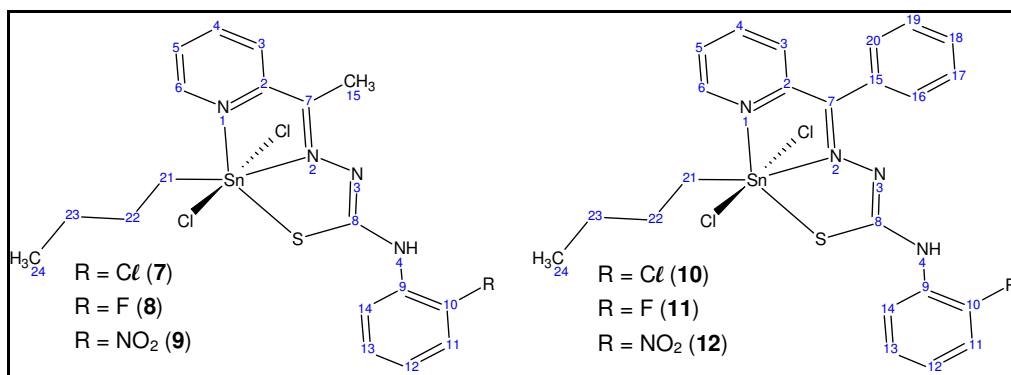


Figura 6.12. Estrutura genérica dos complexos de Sn(IV) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.

Tabela 6.21. Rendimento, ponto de fusão*, análise elementar**, massa molar e condutividade molar (em $\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$) dos complexos de Sn(IV) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Composto	Rend. (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	MM (g mol ⁻¹)	Λ_M
[Sn(2Ac4oClPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (7)	85	238,6-240,7 (149,5-152,0)	39,31 (39,27)	3,87 (3,84)	10,07 (10,18)	550,52	6,51
[Sn(2Ac4oFPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (8)	79	230,8-233,8 (165,2-166,2)	40,49 (40,48)	3,99 (3,96)	10,37 (10,49)	534,07	6,86
[Sn(2Ac4oNO ₂ Ph)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (9)	92	239,8-240,6 (150,9-154,9)	38,61 (38,53)	3,71 (3,77)	12,39 (12,48)	561,07	5,74
[Sn(2Bz4oClPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (10)	91	227,5-231,5 (129,4-130,1)	45,06 (45,09)	3,73 (3,78)	8,79 (9,15)	612,59	9,68
[Sn(2Bz4oFPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (11)	63	215,3-219,9 (156,0-158,0)	46,31 (46,34)	3,99 (3,89)	9,41 (9,40)	596,14	5,03
[Sn(2Bz4oNO ₂ Ph)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (12)	84	225,1-226,2 (155,2-155,8)	44,35 (44,33)	3,69 (3,72)	11,19 (11,24)	623,14	7,50

* Ponto de fusão dos respectivos ligantes entre parênteses; ** Valores teóricos entre parênteses.

6.3.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C, ¹¹⁹Sn, DEPT, COSY e HMQC foram obtidos para os complexos de estanho(IV) (**7-12**) em soluções de DMSO-*d*₆. A numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes é apresentada na Figura 6.12 e os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 6.22-6.26.

Como verificado para os complexos de antimônio(III), os espectros de RMN de ^1H dos complexos de estanho(IV) revelam apenas um sinal para cada hidrogênio e cada carbono, indicando a presença de um único isômero, a forma *E*. A ausência do sinal de N3-H (Figura 6.13) indica que os ligantes encontram-se na sua forma aniônica. Além disso, observa-se que a complexação provoca deslocamentos mais intensos nos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos da piridina e nos carbonos C7 e C8 das tiossemicarbazonas. Estes resultados sugerem que as tiossemicarbazonas coordenam-se ao estanho pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos de estanho(IV) apresentam ainda os sinais referentes ao grupo *n*-butil, confirmando a presença deste na estrutura dos complexos.

As constantes de acoplamento $^1\text{J}(^{13}\text{C}\text{-}^{119}\text{Sn})$ dos complexos exibem valores entre 934,4 e 946,6 Hz, enquanto os valores de $^2\text{J}(^{13}\text{C}\text{-}^{119}\text{Sn})$ e $^3\text{J}(^{13}\text{C}\text{-}^{119}\text{Sn})$ foram 52,1-54,1 e 160,5-163,8 Hz, respectivamente. Em todos os casos, $^2\text{J} < ^3\text{J}$, conforme observado anteriormente para complexos de estanho contendo tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida.⁸

Os espectros de RMN de ^{119}Sn dos complexos (7-12) apresentam apenas um sinal na região de $-(343\text{-}348)$ ppm, compatível com a presença de um sítio de estanho. As posições dos sinais referentes ao ^{119}Sn estão de acordo com dados relatados para complexos de estanho hexacoordenados.³⁸ De fato, os deslocamentos químicos de ^{119}Sn observados são similares àquele encontrado para o complexo $[\text{Sn}(\text{2Bz4Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ ($\delta = -353$ ppm)²⁴, o qual também apresenta uma tiossemicarbazona aniônica tridentada, juntamente com dois íons cloreto e um grupo *n*-butil na esfera de coordenação do metal.

³⁸ J. Otera, J. Organomet. Chem. 221 (1981) 57.

Tabela 6.23. Atribuições (A), número de hidrogênio (N°) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H dos complexos de estanho(III) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-benzilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- d_6)

A	N°	H2Bz4oClPh		10	H2Bz4oFPh		11	H2Bz4oNO ₂ Ph		12
		Z	E		Z	E		Z	E	
N3-H	1	13,19	10,53	--	13,20	10,44	--	13,51	--	--
N4-H	1	10,34	9,21	10,27	10,23	9,20	10,31	11,18	9,59	10,54
H3	1	8,47	--	8,30	8,54	--	8,30	8,32	8,50	8,35
H4	1	8,05	7,90	7,65	8,04	7,90	7,66	8,15-8,01	--	8,00
H5	1	8,21	--	7,95	8,23	--	7,96	8,15-8,01	--	7,97
H6	1	8,89	8,66	9,01	8,86	8,68	9,01	8,90	8,56	9,04
H21	2	---	---	2,16	---	---	2,17	---	---	2,20
H22	2	---	---	1,81	---	---	1,82	---	---	1,83
H23	2	---	---	1,50	---	---	1,50	---	---	1,51
H24	3	---	---	0,96	---	---	0,97	---	---	0,97

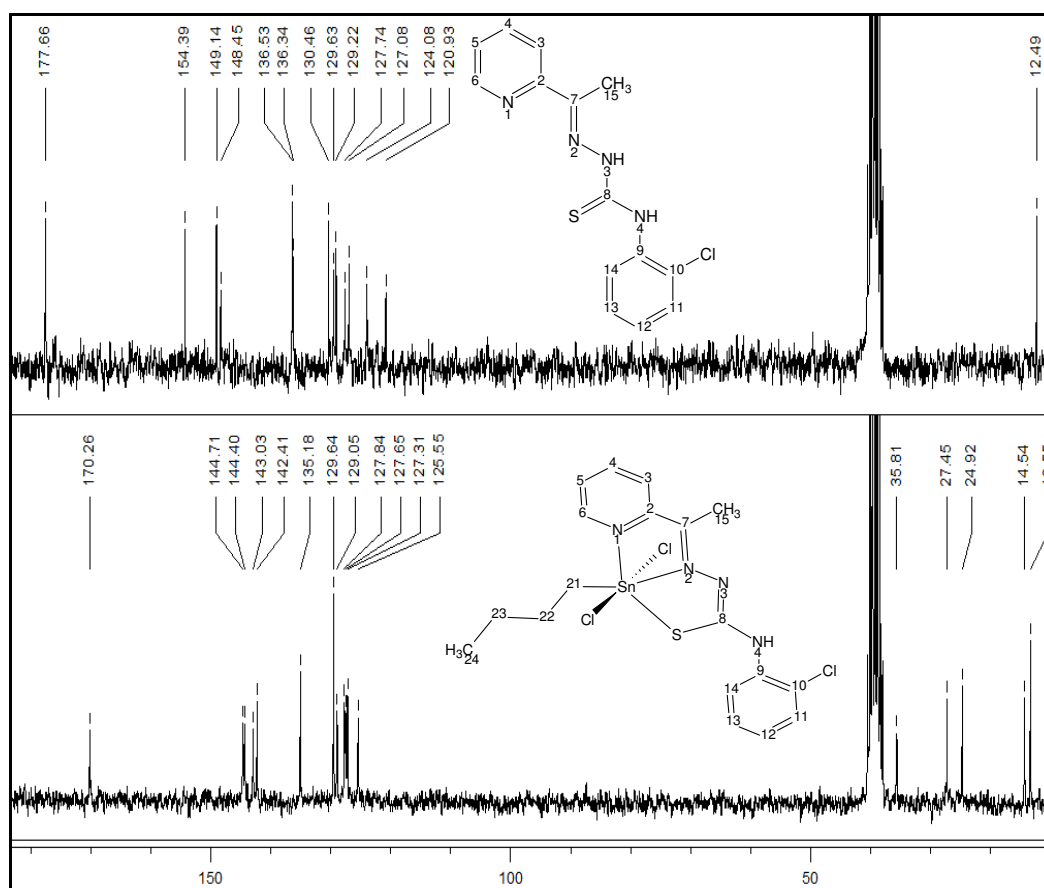


Figura 6.14. Espectros de RMN de ^{13}C A) do ligante H2Ac4oClPh e B) do seu respectivo complexo $[\text{Sn}(\text{2Ac4oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (**7**), obtido em DMSO- d_6 .

Tabela 6.24. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- d_6)

Atribuição	DEPT	H2Ac4oCℓPh	7	H2Ac4oFPh	8	9
C2	--	154,39	144,40	154,37	153,19	146,23
C3	↑	120,93	129,05	121,04	127,37	126,01
C4	↑	136,53	143,03	136,25	143,08	143,16
C5	↑	124,08	129,64	124,04	127,52	126,88
C6	↑	148,45	144,71	148,39	144,78	144,83
C7	--	149,15	142,41	149,24	142,37	142,13
C8	--	177,66	170,26	178,33	169,69	168,40
C15	↑	12,49	13,56	12,42	14,14	13,57
C16	↓	--	35,80	--	36,38	35,91
C17	↓	--	27,45	--	28,05	27,46
C18	↓	--	24,92	--	25,50	24,88
C19	↑	--	14,55	--	15,21	14,62

Tabela 6.25. Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- d_6)

Atribuição	DEPT	H2Bz4oCℓPh	10	H2Bz4oFPh	11	H2Bz4oNO ₂ Ph	12
C2	--	153,09	143,26	151,18	157,49	151,08	145,33
C3	↑	121,73	128,41	124,96	127,11	124,99	128,50
C4	↑	136,52	143,07	138,12	143,78	138,21	143,33
C5	↑	124,17	129,39	126,17	127,81	125,16	128,95
C6	↑	148,57	145,26	148,76	145,31	148,78	145,46
C7	--	147,03	142,53	144,01	142,48	144,54	142,23
C8	--	177,29	170,97	177,58	170,27	176,20	169,59
C21	↓	--	35,53	--	35,54	--	36,68
C22	↓	--	27,52	--	27,51	--	28,47
C23	↓	--	24,97	--	24,94	--	25,89
C24	↑	--	13,61	--	1358	--	14,56

Tabela 6.26. Deslocamento químico (ppm) do sinal de RMN de ^{119}Sn e acoplamentos $^n\text{J}(^{13}\text{C}-^{119}\text{Sn})$ dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus respectivos ligantes (DMSO- d_6)

Complexo	δ ^{119}Sn	$^1\text{J}(^{13}\text{C}-^{119}\text{Sn})$	$^2\text{J}(^{13}\text{C}-^{119}\text{Sn})$	$^3\text{J}(^{13}\text{C}-^{119}\text{Sn})$
[Sn(2Ac4oClPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (7)	-347	945,8	52,6	163,4
[Sn(2Ac4oFPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (8)	-347	946,1	52,2	163,8
[Sn(2Ac4oNO ₂ Ph)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (9)	-348	946,6	53,9	161,0
[Sn(2Bz4oClPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (10)	-343	934,9	52,3	162,2
[Sn(2Bz4oFPh)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (11)	-344	934,4	52,1	161,6
[Sn(2Bz4oNO ₂ Ph)(<i>n</i> -Bu)Cl ₂] (12)	-345	934,4	54,1	160,5

6.3.3 Espectroscopia de Infravermelho

As bandas mais úteis para a determinação do modo de coordenação da tiossemicarbazona ao metal nos complexos **7-12** encontram-se na Tabela 6.27.

As bandas de $\nu(\text{CN})$ das tiossemicarbazonas livres deslocam-se de 1582-1618 cm^{-1} para 1592-1617 cm^{-1} nos seus respectivos complexos, indicando a coordenação pelo nitrogênio imínico. A coordenação do ligante ao centro metálico por este nitrogênio é suportada pelo aparecimento de novas bandas em 427-474 cm^{-1} , as quais são atribuídas ao estiramento $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imin}})$.^{10,24}

O modo de vibração $\nu(\text{CS})$ encontra-se em regiões de menor energia nos complexos (745-766 cm^{-1}) quando comparado com seus respectivos ligantes (782-801 cm^{-1}), indicando a coordenação pelo enxofre na forma de tiolato. Por outro lado, a deformação no plano do anel piridínico desloca-se para energias maiores com a coordenação, sugerindo que o nitrogênio piridínico também coordena-se ao estanho(IV). As bandas atribuídas aos modos $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ e $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ presentes em 330-353 e 258-327 cm^{-1} , respectivamente, confirmam a coordenação das tiossemicarbazonas por estes átomos.^{10,24}

Assim, os dados de infravermelho dos complexos indicam que as tiossemicarbazonas coordenam-se ao metal pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}-\text{N}-\text{S}$, apresentando configuração *E*, conforme sugerido por RMN.

Os estiramentos atribuídos às vibrações $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ e $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ foram observados respectivamente em 229-270 e 526-576 cm^{-1} , concordando com a proposta de estrutura dos complexos, onde o centro metálico está coordenado a íons cloreto e ao grupo *n*-butil.^{8,24}

Tabela 6.27. Atribuição das principais bandas de infravermelho dos complexos de estanho(IV) das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina, dadas em cm^{-1}

Composto	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{SnC})$	$\nu(\text{SnN})$	$\nu(\text{SnS})$	$\nu(\text{SnN}_{\text{py}})$	$\nu(\text{SnCl})$
H2Ac4oClPh	1582	783	621	----	----	----	----	----
(7)	1609	758	651	533	444	330	294	261
H2Ac4oFPh	1615	784	620	----	----	----	----	----
(8)	1613	758	650	526	463	340	258	229
H2Ac4oNO ₂ Ph	1608	782	621	----	----	----	----	----
(9)	1598	745	651	575	432	353	327	269
H2Bz4oClPh	1593	798	614	----	----	----	----	----
(10)	1592	766	637	533	444	330	294	261
H2Bz4oFPh	1618	801	614	----	----	----	----	----
(11)	1617	753	648	576	474	346	268	244
H2Bz4oNO ₂ Ph	1606	797	607	----	----	----	----	----
(12)	1604	745	650	547	427	347	306	270

6.3.4 Cristalografia de Raios X

Monocristais adequados para difração de raios X foram obtidos para os complexos (7), (9), (10) e (12) a partir de solução dos compostos em DMSO-*d*₆. Além disso, após recristalização de 8 em DMSO-*d*₆, cristais de $[\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2] \cdot \text{DMSO}$ (8a) também foram obtidos.

Os dados cristalográficos foram coletados no difratômetro Xcalibur Atlas *GEMINI*, com radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073$) e temperatura de 298(2) K. Os resumos da coleção de dados e do refinamento^{20,21,22,23,39} estão dispostos na Tabela 6.28 e 6.28. As estruturas determinadas para os complexos estão apresentadas na Figura 6.15 e as distâncias e ângulos de ligação encontram-se nas Tabelas 6.30 e 6.31, respectivamente.

³⁹ A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M.C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J.Appl. Crystallogr.* 27 (1994) 435.

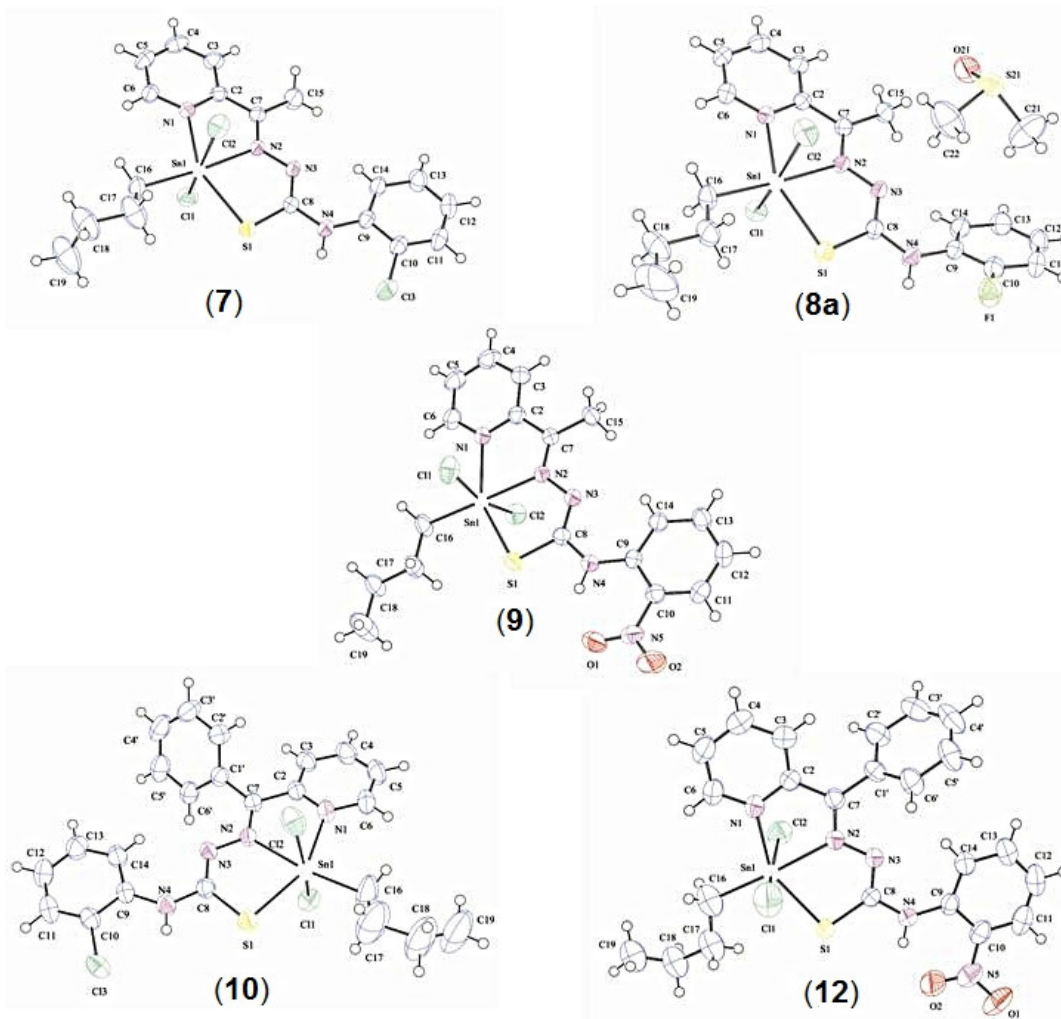


Figura 6.15. Diagramas ORTEP dos complexos $[\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{ClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7), $[\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{FPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2] \cdot \text{DMSO}$ (8a), $[\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{ClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (10) e $[\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{NO}_2\text{Ph})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (12).

Tabela 6.28. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento dos complexos [Sn(2Ac4oCℓPh)(*n*-Bu)Cℓ₂] (**7**), [Sn(2Ac4oFPh)(*n*-Bu)Cℓ₂]·DMSO (**8a**) e [Sn(2Ac4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cℓ₂] (**9**)

Composto	(7)	(8a)	(9)
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₁ Cl ₃ N ₄ SSn	C ₂₀ H ₂₇ Cl ₂ FN ₄ OS ₂ Sn	C ₁₈ H ₂₁ Cl ₂ N ₅ O ₂ SSn
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	550,49	612,17	561,05
Dimensões do cristal (mm)	0,32 x 0,21 x 0,10	0,21 x 0,13 x 0,10	0,58 x 0,25 x 0,09
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 _{1/c}	Monoclínico, P2 _{1/c}	Triclínico, Pī
a (Å)	8,41960(10)	8,2713(3)	7,6909(3)
b (Å)	11,2272(2)	11,9709(3)	10,5923(4)
c (Å)	22,7845(4)	26,1990(8)	14,2098(5)
α (°)	90	90	87,128(3)
β (°)	92,541(2)	91,011(3)	85,354(3)
γ (°)	90	90	73,447(3)
V (Å ³)	2151,67(6)	2593,69(14)	1105,53(7)
F(000)	1096	1232	560
Z; Densidade calc. (g·cm ⁻³)	4; 1,699	4; 1,568	2; 1,685
μ (mm ⁻¹)	1,668	1,379	1,516
Intervalo de θ (°)	4,12 – 26,37	4,13 – 26,37	4,13 – 26,37
	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 10	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 10	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 9
Intervalo de hkl	-13 ≤ <i>k</i> ≤ 14	-14 ≤ <i>k</i> ≤ 14	-12 ≤ <i>k</i> ≤ 13
	-23 ≤ <i>l</i> ≤ 28	-32 ≤ <i>l</i> ≤ 32	-17 ≤ <i>l</i> ≤ 17
Correção de absorção	Analítica	Analítica	Multi-scan
Max. / Min. transmissão	0,866 / 0,675	0,891 / 0,804	1,000 / 0,805
Reflexões medidas	16826	23141	8531
Reflexões únicas / R _{int}	4381 (0,0531)	5288 (0,0588)	4507 (0,0379)
Parâm. Ref. / restrições	245 / 0	281 / 0	263 / 0
R (obs/all)	0,0304 / 0,0373	0,0289 / 0,0446	0,0351 / 0,0414
wR (obs/all)	0,0781 / 0,0807	0,0598 / 0,0627	0,0859 / 0,0885
S	1,030	0,954	0,999
Δρ max/min (e Å ⁻³)	0,605 / -0,581	0,0383 / -0,340	0,424 / -0,634

Tabela 6.29. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento dos complexos [Sn(2Bz4oClPh)(*n*-Bu)Cl₂] (**10**) e [Sn(2Bz4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (**12**)

Composto	(10)	(12)	
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₃ N ₄ SSn	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₂ N ₅ O ₂ SSn	
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	612,55	623,11	
Dimensões do cristal (mm)	0,40 x 0,20 x 0,05	0,60 x 0,46 x 0,14	
Sistema cristalino, grupo espacial	Triclínico, Pī	Ortorrômico, Pbca	
Dimensões da célula unitária	a (Å)	8,9112(2)	12,23330(10)
	b (Å)	10,1381(2)	18,7376(2)
	c (Å)	15,1284(3)	22,6647(3)
	α (°)	78,7360(10)	90
	β (°)	75,825(2)	90
	γ (°)	74,409(2)	90
	V (Å ³)	1264,03(5)	5195,26(10)
F(000)	612	2496	
Z; Densidade calc. (g cm ⁻³)	2; 1,609	8; 1,593	
μ (mm ⁻¹)	1,429	1,300	
Intervalo de θ (°)	4,21 – 26,37	4,08 – 26,37	
Intervalo de hkl	-11 ≤ h ≤ 11	-15 ≤ h ≤ 15	
	-12 ≤ k ≤ 12	-23 ≤ k ≤ 23	
	-18 ≤ l ≤ 18	-28 ≤ l ≤ 28	
Correção de absorção	Multi-scan	Multi-scan	
Max. / Min. Transmissão	1,000 / 0,766	1,000 / 0,573	
Reflexões medidas	25937	106109	
Reflexões únicas / R _{int}	5154 (0,0373)	5296 (0,0419)	
Parâm. Ref. / restrições	290 / 0	290 / 0	
R (obs/all)	0,0301 / 0,0378	0,0434 / 0,0547	
wR (obs/all)	0,0757 / 0,0781	0,1055 / 0,1132	
S	1,047	1,100	
Δρ max/min (e Å ⁻³)	0,686 / -0,586	1,184 / -0,984	

Os complexos (**7**) e (**8a**) cristalizam-se no sistema monoclinico, enquanto **9** e **10** cristalizam-se no sistema triclinico. Por sua vez, o complexo (**11**) cristaliza-se no sistema ortorrômbico.

Os dados cristalográficos indicam que os complexos são moléculas neutras, as quais apresentam geometria em torno do centro metálico descrita como octaédrica distorcida. Em todos os complexos, o ambiente de coordenação do íon central é N_2SCl_2C , onde o Sn(IV) é coordenado a uma tiossemicarbazona aniônica tridentada, bem como a dois íons cloreto e um grupo *n*-butil. O complexo (**8a**) apresenta ainda uma molécula de DMSO como solvente de cristalização.

As distâncias e ângulos de ligação observados para os complexos são muito similares. A distância entre o estanho e o nitrogênio imínico (2,209-2,241 Å) é ligeiramente menor que a distância verificada entre o estanho e o nitrogênio piridínico (2,243-2,261 Å).

O ângulo formado por N(1)-Sn(1)-S(1) de 149,90(9)-151,30(6) ° desvia fortemente do valor esperado (180 °). A distorção deste ângulo em relação a um octaedro perfeito ocorre provavelmente devido ao requerimento espacial exigido pelo sistema quelante das tiossemicarbazonas.^{8,10} Por outro lado, os ângulos Cl(1)-Sn(1)-Cl(2) (164,50-167,13 °) e N(2)-Sn(1)-C(16) (172,11-178,27 °) encontram-se mais próximos do valor ideal.

Com o intuito de verificar as principais variações nas estruturas das tiossemicarbazonas após a coordenação, os comprimentos e ângulos de ligação de H2Ac4oClPh¹⁷ e de H2Bz4oNO₂Ph (seção 6.1.3) também são apresentados nas Tabelas 6.30 e 6.31.

Comparando-se as estruturas dos complexos (**7**) e (**12**) com as estruturas das suas correspondentes tiossemicarbazonas, verifica-se um alongamento da ligação C(8)-S(1), a qual muda de 1,654(3) Å em H2Ac4oClPh¹⁷ para 1,742(3) Å em **7** e de 1,660(2) Å em H2Bz4oNO₂Ph para 1,740(4) Å em **12**. Além disso, ocorre uma diminuição do comprimento da ligação N(3)-C(8), o qual passa de 1,351(3)-1,364(3) Å nas bases livres para 1,307(3) e 1,303(5) Å em **7** e **12**, respectivamente. Estas variações concordam com a desprotonação de N(3)-H e formação de um sistema altamente deslocalizado, onde N(3)-C(8) adquire um caráter de dupla ligação e C(8)-S(1) muda de tiona (C=S) para tiolato (C-S).

O empacotamento molecular dos complexos (**7**) e (**8a**) revelam ligações de hidrogênio intermoleculares fracas com formação de cadeias moleculares (ver Figura 6.16). Nos demais complexos, apenas ligações de hidrogênio intramoleculares foram observadas.

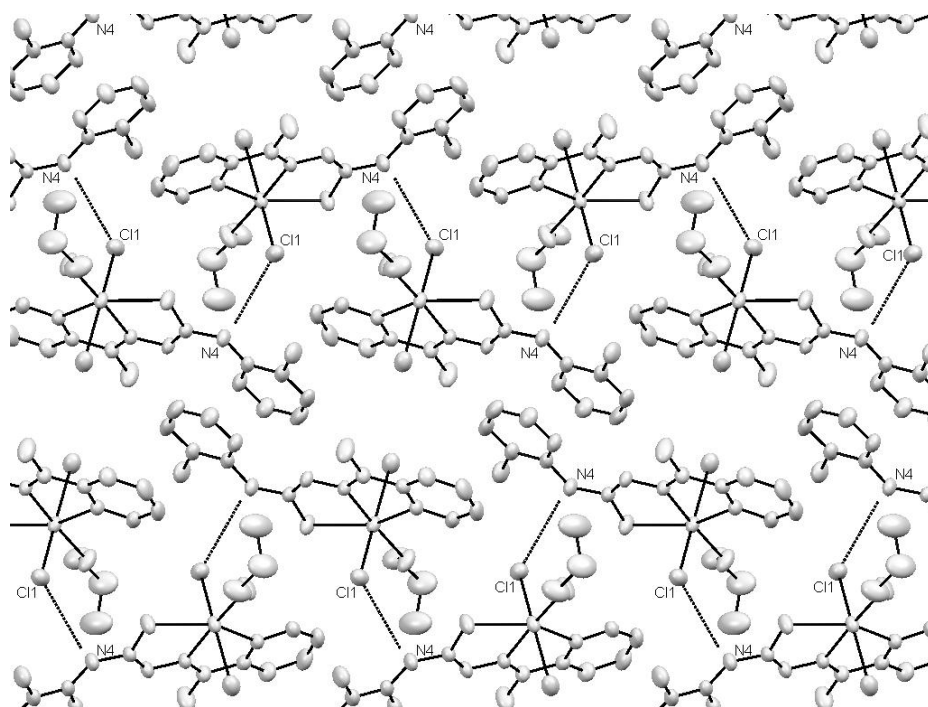


Figura 6.16. Empacotamento molecular do complexo $[\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oClPh})(n\text{-Bu})\text{Cl}_2]$ (7).

Tabela 6.30. Comprimentos de ligação (Å) selecionados das tiossemicarbazonas H2Ac4oCℓPh¹⁷ e H2Bz4oNO₂Ph (seção 6.1.3) e dos complexos [Sn(2Ac4oCℓPh)(*n*-Bu)Cl₂] (7), [Sn(2Ac4oFPh)(*n*-Bu)Cl₂]·DMSO (8a), [Sn(2Ac4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (9), [Sn(2Bz4oCℓPh)(*n*-Bu)Cl₂] (10) e [Sn(2Bz4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (12). Desvios padrão entre parênteses

Átomos	H2Ac4oCℓPh* ¹⁷		(7)	(8a)	(9)	(10)	H2Bz4oNO ₂ Ph	(12)
C(7)-N(2)	1,281(3)	1,278(3)	1,292(3)	1,294(3)	1,298(4)	1,294(3)	1,297(3)	1,292(5)
N(2)-N(3)	1,362(3)	1,361(3)	1,367(3)	1,358(3)	1,374(3)	1,361(3)	1,358(2)	1,360(5)
N(3)-C(8)	1,359(3)	1,351(3)	1,307(3)	1,317(3)	1,298(4)	1,308(3)	1,364(3)	1,303(5)
C(8)-S(1)	1,654(3)	1,654(3)	1,742(3)	1,747(3)	1,749(3)	1,745(3)	1,660(2)	1,740(4)
C(8)-N(4)	1,328(4)	1,336(3)	1,361(3)	1,348(3)	1,360(4)	1,362(3)	1,353(3)	1,370(5)
Sn(1)-N(1)	---	---	2,245(2)	2,261(2)	2,243(2)	2,244(2)	---	2,248(4)
Sn(1)-N(2)	---	---	2,222(2)	2,209(2)	2,228(2)	2,231(2)	---	2,241(3)
Sn(1)-S(1)	---	---	2,4843(7)	2,4739(7)	2,4848(8)	2,4761(8)	---	2,4863(13)
Sn(1)-Cl(1)	---	---	2,5072(8)	2,5260(7)	2,5025(9)	2,4818(8)	---	2,4693(16)
Sn(1)-Cl(2)	---	---	2,5019(8)	2,4681(8)	2,4807(8)	2,5167(9)	---	2,4818(13)
Sn(1)-C(16)	---	---	2,133(3)	2,137(3)	2,142(3)	2,134(4)	---	2,150(6)

* Duas moléculas na unidade assimétricas.

Tabela 6.31. Ângulos de ligação (°) selecionados das tiossemicarbazonas H2Ac4oCℓPh¹⁷ e H2Bz4oNO₂Ph (seção 6.1.3) e dos complexos [Sn(2Ac4oCℓPh)(*n*-Bu)Cl₂] (7), [Sn(2Ac4oFPh)(*n*-Bu)Cl₂]·DMSO (8a), [Sn(2Ac4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (9), [Sn(2Bz4oCℓPh)(*n*-Bu)Cl₂] (10) e [Sn(2Bz4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (12). Desvios padrão entre parênteses

Átomos	H2Ac4oCℓPh* ¹⁷		(7)	(8a)	(9)	(10)	H2Bz4oNO ₂ Ph	(12)
C(7)-N(2)-N(3)	119,1(2)	118,7(2)	118,4(2)	118,4(2)	118,4(2)	120,0(2)	120,52(18)	118,6(3)
N(2)-N(3)-C(8)	118,2(2)	118,9(2)	115,0(2)	115,4(2)	114,6(2)	115,5(2)	120,09(17)	114,7(3)
N(3)-C(8)-S(1)	121,0(2)	121,5(2)	128,5(2)	128,08(19)	129,1(2)	129,0(2)	118,09(15)	129,1(3)
N(3)-C(8)-N(4)	114,7(2)	114,4(2)	118,8(2)	118,2(2)	120,0(3)	118,9(2)	113,31(17)	119,2(4)
N(4)-C(8)-S(1)	124,3(2)	124,1(2)	112,7(2)	113,69(18)	110,9(2)	112,0(2)	128,59(15)	111,8(3)
N(1)-Sn(1)-N(2)	----	----	72,07(8)	72,58(7)	72,26(8)	72,42(8)	----	72,33(13)
N(1)-Sn(1)-S(1)	----	----	150,08(6)	151,30(6)	150,16(6)	151,22(6)	----	149,90(9)
N(1)-Sn(1)-Cl(1)	----	----	83,57(6)	81,64(6)	83,19(7)	84,18(6)	----	83,59(11)
N(1)-Sn(1)-Cl(2)	----	----	85,64(6)	84,83(6)	84,78(7)	85,86(6)	----	84,18(10)
N(1)-Sn(1)-C(16)	----	----	102,32(11)	104,14(10)	106,47(11)	99,81(15)	----	105,4(2)
N(2)-Sn(1)-S(1)	----	----	78,10(6)	78,85(5)	78,06(6)	78,82(6)	----	77,65(9)
N(2)-Sn(1)-Cl(1)	----	----	84,64(6)	84,60(6)	86,99(6)	85,55(6)	----	87,52(10)
N(2)-Sn(1)-Cl(2)	----	----	85,38(6)	84,16(6)	84,71(6)	82,91(6)	----	82,32(9)
N(2)-Sn(1)-C(16)	----	----	174,04(10)	176,70(9)	178,27(10)	172,11(16)	----	175,9(2)
S(1)-Sn(1)-Cl(1)	----	----	91,59(3)	93,19(3)	92,36(3)	92,68(3)	----	93,11(6)
S(1)-Sn(1)-Cl(2)	----	----	94,28(3)	95,07(3)	95,66(3)	91,74(3)	----	94,07(5)
S(1)-Sn(1)-C(16)	----	----	107,40(10)	104,40(8)	103,27(10)	108,97(14)	----	104,7(2)
Cl(1)-Sn(1)-Cl(2)	----	----	167,13(3)	164,50(3)	167,01(3)	166,60(3)	----	166,02(6)
Cl(1)-Sn(1)-C(16)	----	----	92,81(12)	94,61(8)	94,04(11)	95,20(16)	----	95,7(3)
Cl(2)-Sn(1)-C(16)	----	----	96,33(12)	96,00(9)	94,03(10)	95,30(17)	----	94,1(3)

* Duas moléculas na unidade assimétricas.

Tabela 6.32. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio dos complexos [Sn(2Ac4oClPh)(*n*-Bu)Cl₂] (7), [Sn(2Ac4oFPh)(*n*-Bu)Cl₂]·DMSO (8a), [Sn(2Ac4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (9), [Sn(2Bz4oClPh)(*n*-Bu)Cl₂] (10) e [Sn(2Bz4oNO₂Ph)(*n*-Bu)Cl₂] (12)

Composto	D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	(D–H...A)
(7)	N(4)-H(4A)...Cl(3)	0,86	2,48	2,933(2)	114,0
	N(4)-H(4A)...Cl(1) #1	0,86	2,88	3,592(3)	140,8
(8a)	N(4)-H(4A)...O(21) #2	0,86	1,90	2,751(3)	171,9
	N(4)–H(4)...O(1)	0,86	1,87	2,589(3)	139,8
(9)	N(4)–H(4)...N(5)	0,86	2,47	2,885(3)	110,7
	N(4)-H(4A)...Cl(3)	0,86	2,38	2,898(2)	119,5
(10)	N(4)-H(4)...N(5)	0,86	2,45	2,867(5)	110,5
	N(4)-H(4)...O(2)	0,86	1,92	2,625(5)	137,7

Transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes: #1 -x,y-1/2,-z+1/2; #2 x-1,y,z.

6.3.5 Atividade Antimicrobiana

Uma vez que a atividade antifúngica de compostos de estanho é bastante conhecida, nós investigamos a atividade dos complexos de estanho(IV) e suas correspondentes tiossemicarbazonas contra diferentes espécies de *Candida*. Os compostos foram testados frente cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 200298), *Candida glabrata* (ATCC 90030) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) são apresentados na Tabela 6.33. Fluconazol, um antifúngico da classe dos triazólicos, foi utilizado como controle positivo.

Os compostos investigados foram ativos frente todas as espécies de *Candida* testadas. Em alguns casos, a atividade foi similar à do fluconazol, conforme observado para H2Ac4oNO₂Ph e os complexos (8), (9) e (12) contra *C. albicans*. Da mesma forma, H2Ac4oNO₂Ph, 9 e 12 apresentam atividade contra *C. parapsilosis* similar ao fármaco de referência. H2Ac4oFPh, H2Ac4oNO₂Ph e 9 também apresentaram valores de CIM próximos ao obtido para o fluconazol contra *C. glabrata*, enquanto os complexos (8) e (12) foram duas vezes mais ativos que o controle positivo. Por sua vez, todos os compostos estudados apresentaram atividade contra *C. krusei* superior à do fluconazol.

Os valores de CIM revelaram que as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina são ligeiramente mais ativas que as correspondentes tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina. Dentre as tiossemicarbazonas, H2Ac4oNO₂Ph exibiu a maior atividade contra as espécies de fungos testadas, apresentando o mesmo valor de CIM em todos

os casos. Por outro lado, as demais tiossemicarbazonas foram, em geral, menos ativas contra *C. parapsilosis*.

Tabela 6.33. Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{mol L}^{-1}$) das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de estanho(IV) frente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
H2Ac4oClPh	13,12	13,12	13,12	26,24
(7)	29,06	29,06	14,53	58,13
H2Ac4oFPh	13,87	13,87	6,94	27,74
(8)	7,49	14,98	3,74	14,98
H2Ac4oNO ₂ Ph	6,34	6,34	6,34	6,34
(9)	7,13	7,13	7,13	7,13
H2Bz4oClPh	21,81	21,81	21,81	43,62
(10)	26,12	26,12	26,12	52,24
H2Bz4oFPh	45,66	45,66	11,42	45,66
(11)	26,84	53,68	13,42	107,4
H2Bz4oNO ₂ Ph	21,20	21,20	21,20	42,40
(12)	6,42	6,42	3,21	6,42
[(<i>n</i> -Bu)SnCl ₃]	> 907,3	> 907,3	> 907,3	> 907,3
Fluconazol	6,53	104,5	6,53	6,53

O sal de estanho [(*n*-Bu)SnCl₃] foi inativo contra todas as espécies testadas. No entanto, em alguns casos, a coordenação ao estanho(IV) resultou em um aumento da atividade antifúngica. O melhor resultado foi verificado para o complexo (12), onde a coordenação de H2Bz4oNO₂Ph ao estanho(IV) aumentou em três vezes a atividade contra *C. albicans* e *C. krusei* e em seis vezes a atividade contra *C. glabrata* e *C. Parapsilosis*. Um aumento da atividade antifúngica também foi observado para o complexo (8), exceto contra *C. parapsilosis*, e para o complexo (11) contra *C. albicans*. Estes resultados sugerem que a associação de tiossemicarbazonas a *n*-butilestanho pode ser uma estratégia interessante para redução de doses.

Analisando-se os valores de CIM dos compostos, verifica-se que a coordenação ao estanho(IV) proporciona efeitos distintos nas atividades antifúngicas das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina. Dentre os ligantes da série 2-acetilpiridina, a presença do grupo nitro parece favorecer a atividade antifúngica. Apesar deste efeito não ser observado para o correspondente derivado de 2-benzoilpiridina H2Bz4oNO₂Ph, o complexo

desta tiossemicarbazona, $[\text{Sb}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**12**), foi o mais ativo de todos os compostos estudados. Propriedades físico-químicas dos complexos, bem como as diferenças intrínsecas entre as espécies de *Candida* estudadas podem ter influenciado a atividade antimicrobiana.

6.3.6 Estudos de Relação Estrutura-Atividade (SAR)

Uma investigação da relação estrutura-atividade foi realizada para as tiossemicarbazonas e seus complexos de estanho(IV) com o intuito de avaliar a influência de algumas propriedades físico-químicas destes compostos na atividade antifúngica. A Tabela 6.34 apresenta os parâmetros físico-químicos dos compostos.

A existência dos isômeros *Z* e *E* foi considerada para a obtenção de matrizes de correlação das tiossemicarbazonas. Analisando-se separadamente os isômeros *Z* e *E* das tiossemicarbazonas, nenhuma correlação foi observada. No entanto, quando os isômeros majoritários são considerados (isômero *E* para H2Ac4oCℓPh, H2Ac4oFPh e H2Ac4oNO₂Ph e isômero *Z* para H2Bz4oCℓPh, H2Bz4oFPh e H2Bz4oNO₂Ph) observa-se uma correlação inversa entre o momento dipolo e a atividade antifúngica. Este resultado indica que valores menores de momento dipolo contribuem para aumentar a atividade dos compostos. De fato, H2Ac4oNO₂Ph é a tiossemicarbazona mais ativa dentre as tiossemicarbazonas estudadas, apresentando o menor valor de momento dipolo.

A obtenção de uma matriz de correlação entre as propriedades físico-químicas dos complexos e suas atividades antifúngicas revelou a presença de uma correlação inversa entre a energia do HOMO e a atividade contra todas as espécies de *Candida*. Esta correlação é corroborada pelos valores de CIM, onde verifica-se que os complexos (**9**) e (**12**), mais ativos contra os fungos testados, apresentam os menores valores de energia de HOMO.

Os estudos de relação estrutura-atividade indicam que propriedades físico-químicas distintas influenciam a atividade antifúngica das tiossemicarbazonas e seus complexos de estanho(IV), sugerindo que seus mecanismos de atividade podem ser diferentes.

Tabela 6.34. Propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de estanho(IV)

Composto	ϵ (HOMO) (u.a.)*	ϵ (LUMO) (u.a.)	Momento dipolo
H2Ac4oCℓPh	-0,2035 (isômero <i>E</i>)	-0,0821 (isômero <i>E</i>)	3,120 (isômero <i>E</i>)
	-0,2033 (isômero <i>Z</i>)	-0,0704 (isômero <i>Z</i>)	5,700 (isômero <i>Z</i>)
H2Ac4oFPh	-0,2026 (isômero <i>E</i>)	-0,0583 (isômero <i>E</i>)	2,843 (isômero <i>E</i>)
	-0,2015 (isômero <i>Z</i>)	-0,0693 (isômero <i>Z</i>)	5,874 (isômero <i>Z</i>)
H2Ac4oNO ₂ Ph	-0,2101 (isômero <i>E</i>)	-0,1021 (isômero <i>E</i>)	0,513 (isômero <i>E</i>)
	-0,2091 (isômero <i>Z</i>)	-0,0891 (isômero <i>Z</i>)	4,279 (isômero <i>Z</i>)
H2Bz4oCℓPh	-0,2018 (isômero <i>E</i>)	-0,0614 (isômero <i>E</i>)	3,187 (isômero <i>E</i>)
	-0,2041 (isômero <i>Z</i>)	-0,0725 (isômero <i>Z</i>)	5,581 (isômero <i>Z</i>)
H2Bz4oFPh	-0,2010 (isômero <i>E</i>)	-0,0600 (isômero <i>E</i>)	3,440 (isômero <i>E</i>)
	-0,2024 (isômero <i>Z</i>)	-0,0715 (isômero <i>Z</i>)	5,588 (isômero <i>Z</i>)
H2Bz4oNO ₂ Ph	-0,2079 (isômero <i>E</i>)	-0,0987 (isômero <i>E</i>)	1,846 (isômero <i>E</i>)
	-0,1989 (isômero <i>Z</i>)	-0,0543 (isômero <i>Z</i>)	6,162 (isômero <i>Z</i>)
7	-0,2234	-0,1026	8,387
8	-0,2249	-0,0986	7,486
9	-0,2305	-0,1090	11,417
10	-0,2199	-0,1026	8,834
11	-0,2174	-0,1011	7,509
12	-0,2290	-0,1080	11,859

* 1 u.a. = 27,211 eV; eV = 627,51 Kcal mol⁻¹

Capítulo 7. Discussão e Conclusões Gerais

O presente trabalho consistiu na obtenção e caracterização de compostos metálicos, visando o estudo destes compostos frente a diferentes sistemas biológicos. Os ligantes e complexos foram previamente planejados de acordo com as características finais desejadas, as quais estão diretamente relacionadas com as atividades farmacológicas de interesse. Foram então planejados candidatos a protótipos de fármacos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiparasitários e antitumorais. As razões para a escolha dessas classes de compostos são descritas a seguir.

Os problemas apresentados pelos fármacos anti-inflamatórios em uso clínico, tais como irritação da mucosa gástrica e outros efeitos colaterais severos justificam a busca por novos agentes anti-inflamatórios. A resistência aos antibióticos em uso clínico constitui ameaça importante à saúde humana e animal, e leva à investigação de novos agentes antimicrobianos. Doenças negligenciadas, como a doença de Chagas e as leishmanioses não recebem a atenção das grandes indústrias farmacêuticas, e os medicamentos utilizados no tratamento dessas enfermidades, além de insatisfatórios, causam efeitos colaterais importantes que dificultam a adesão do paciente. Finalmente, a constante procura por agentes antitumorais que sejam mais eficazes e seletivos é um dos desafios da Química Medicinal hoje em dia. No presente trabalho, procuramos dar uma contribuição para as investigações em Química Medicinal na procura de novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiparasitários e antitumorais.

As hidrazonas apresentam uma variedade de atividades farmacológicas, dentre elas, atividade anti-inflamatória.¹ O zinco, além de ser considerado um elemento traço essencial para manutenção de diversos processos fisiológicos, apresenta baixa toxicidade em humanos. Estudos demonstram que o zinco é um importante agente imunorregulatório com atividades antiapoptóticas e anti-inflamatórias.² Por estas razões, alguns compostos contendo zinco são utilizados na clínica e diversos estudos demonstram a busca por complexos de zinco como potenciais fármacos. Desta forma, complexos de zinco com hidrazonas derivadas de salicilaldeído foram obtidos e testados contra modelos animais de nocicepção e inflamação.

¹ H.J.C. Bezerra-Netto, D.I. Lacerda, A.L.P. Miranda, H.M. Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (2006) 7924.

² P.D. Zalewski, A.Q. Truong-Tran, D. Grosser, L. Jayaram, C. Murgia, R.E. Ruffin, *Pharmacol. Ther.* 105 (2005) 127.

Foram obtidos complexos de zinco(II) com hidrazonas sintetizadas no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), as quais apresentam atividade anti-inflamatória. As caracterizações realizadas para os complexos de zinco(II) sugerem a formação dos dímeros $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$, $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$ e $[Zn(LASSBio-1064)]_2$. Estes resultados indicam que a presença do grupo fenol na estrutura do ligante favorece a formação de complexos de zinco binucleares com ponte fenoxo. Este comportamento também foi observado por outro membro do nosso grupo de pesquisa para complexos de zinco de salicilaldeído semicarbazona³, bem como para complexos de zinco de outros ligantes contendo o grupo fenol^{4,5}, onde a presença desse grupo induziu a formação compostos diméricos.

Os compostos de zinco estudados mostraram significativa atividade no modelo experimental de nocicepção através de constrições induzidas por ácido acético, provocando redução no número de constrições. A atividade antinociceptiva foi favorecida pela formação do complexo de zinco(II) no caso da hidrazona $H_2LASSBio-466$ e seu complexo $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$. Por outro lado, a coordenação de $H_2LASSBio-1064$ ao zinco(II) não promoveu melhora na atividade antinociceptiva dos compostos.

No modelo de nocicepção induzida por formaldeído, $H_2LASSBio-466$ inibiu apenas a primeira fase, enquanto seu complexo de zinco(II) $[Zn(LASSBio-466)H_2O]_2$ foi ativo na segunda fase, indicando sua capacidade de inibir nocicepção associada com resposta inflamatória. Assim, verifica-se que a coordenação alterou o perfil farmacológico de $H_2LASSBio-466$. Por outro lado, o efeito da hidrazona $H_2LASSBio-1064$ em ambas as fases neurogênica e inflamatória desapareceu após a formação dos complexos $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$ e $[Zn(LASSBio-1064)]_2$, indicando que a coordenação reduziu a resposta antinociceptiva dessa hidrazona.

As hidrazonas e seus complexos de zinco(II) também apresentaram atividade antinociceptiva associada com dor inflamatória, com inibição do processo de migração celular comparável ou superior ao fármaco de referência indometacina. Estes resultados indicam um expressivo comportamento anti-inflamatório dos compostos. Porém, nenhuma melhora da atividade após a complexação foi observada nesse caso.

³ G.L. Parrilha, R.P. Vieira, A.P. Rebolledo, I.C. Mendes, L.M. Lima, E.J. Barreiro, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 1891.

⁴ S. Ay, R.E. Ziegert, H. Zhang, M. Nieger, K. Rissanen, K. Fink, A. Kubas, R.M. Gschwind, S. Bräse, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12899.

⁵ J.-H. Wang, P.F. Yan, G.-M. Li, J.-W. Zhang, P. Chen, M. Suda, Y. Einaga, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 3706.

As hidrazonas e seus complexos de zinco não aumentaram a latência de resposta no modelo da placa quente.

Os resultados apresentados pelas hidrazonas derivadas de salicilaldeído e seus complexos de zinco(II) sugerem que a coordenação pode afetar a biodisponibilidade das hidrazonas, alterando o perfil farmacológico das mesmas. Em princípio, a coordenação não se mostrou uma boa estratégia para a maioria dos estudos realizados. Porém, a literatura relata que a coordenação ao zinco(II) pode diminuir a toxicidade gastrointestinal, aumentando o índice terapêutico do composto.⁶ Desta forma, estudos posteriores serão realizados para averiguar o efeito da complexação na toxicidade gastrointestinal dos complexos de zinco apresentados nesse trabalho.

A obtenção de complexos de gálio(III) com hidrazonas visou, principalmente, a obtenção de compostos com atividades antimicrobianas e antitumorais, onde o íon gálio(III) poderia atuar perturbando o metabolismo do ferro(III) no organismo. Desta forma, foram obtidos complexos de gálio(III) com 2-acetilpiridina fenil hidrazona (H2AcPh) e 2-benzoilpiridina fenil hidrazona (H2BzPh), assim como seus derivados com substituintes em posição *para* no anel fenila: H2Ac p ClPh, H2Ac p NO₂Ph, H2Bz p ClPh e H2Bz p NO₂Ph. Os complexos obtidos apresentam a fórmula geral [Ga(L)₂] \cdot NO₃ \cdot xH₂O, onde L representa a hidrazona desprotonada. A estrutura cristalográfica do composto [Ga(2AcPh)₂]⁺ foi obtida, onde verifica-se um centro de gálio(III) hexacoordenado com duas moléculas de ligante na forma aniônica. O mapa de densidade eletrônica deste complexo mostra que o contra-íon nitrato e possíveis moléculas de solvente estão severamente distorcidos na rede cristalina. Mesmo assim, a estrutura confirma a obtenção do complexo com o ambiente de coordenação proposto pelas demais análises utilizadas para a caracterização.

Estudos de atividade antimicrobiana dos complexos de gálio(III) com as hidrazonas indicaram que a coordenação ao gálio(III) não resultou em uma redução significativa nos valores de concentração inibitória mínima (CIM) frente *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, a atividade antifúngica dos complexos de gálio(III) de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina apresentou significativo aumento contra *Candida albicans*. No caso dos complexos de gálio(III) com as hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina, a baixa solubilidade dos ligantes e complexos impossibilitou a determinação dos seus valores de CIM, não sendo possível averiguar a influência da coordenação na atividade antifúngica destes compostos.

⁶ C.T. Dillon, T.W. Hambley, B.J. Kennedy, P.A. Lay, Q. Zhou, N.M. Davies, J.R. Biffin, H.L. Regtop, Chem. Res. Toxicol. 16 (2003) 28.

Uma vez que hidrazonas mostram atividade contra células tumorais⁷, e considerando-se a necessidade de se obter fármacos eficazes para o tratamento de glioblastomas, que representam os mais malignos tumores cerebrais primários, as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de gálio(III) foram testadas quanto à citotoxicidade contra duas linhagens de células de glioblastoma diferentes. Foram empregadas células U87, que expressam a proteína pró-apoptótica p53 e células T98, que expressam a proteína p53 mutante. Sabe-se que as células que não expressam a proteína p53 ou aquelas que expressam a proteína p53 mutante são menos sensíveis aos agentes anticancerígenos do que células que expressam essa proteína.⁸

Em um estudo preliminar utilizando os compostos na concentração 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina apresentaram uma boa atividade citotóxica contra as células estudadas. Além disso, a complexação aumentou, em vários casos, a atividade citotóxica dos compostos. Uma vez que o nitrato de gálio não apresentou nenhum efeito citotóxico nas linhagens celulares testadas, pode-se propor que a coordenação tenha aumentado a biodisponibilidade do íon gálio(III) e/ou das hidrazonas, revelando-se uma estratégia interessante para a obtenção de compostos mais ativos.

Valores de IC_{50} foram determinados para as hidrazonas, mas não para seus complexos de gálio(III) devido à baixa solubilidade dos mesmos. Com exceção de $\text{H2BzpNO}_2\text{Ph}$, todas as hidrazonas foram altamente ativas frente às células de glioblastoma estudadas. Os melhores resultados foram observados para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina com valores de IC_{50} entre 0,07 e 0,94 nmol L^{-1} para as células U87 e entre 0,43 e 1,17 nmol L^{-1} para as células T98. Estes resultados demonstram que as hidrazonas estudadas apresentam atividade tanto contra as células que expressam a proteína p53 (U87) quanto contra as células que expressam a proteína p53 mutante (T98). Desse modo, o mecanismo de ação das hidrazonas poderia envolver ou não a proteína p53. Como foram observadas alterações morfológicas características de apoptose em ambas as linhagens, a apoptose poderia ser via p53 ou ser independente de p53.

Um dos fatores que podem ter influenciado para uma melhor atividade das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina é o menor caráter lipofílico que estas moléculas apresentam comparado com a lipofilicidade das hidrazonas derivadas de 2-benzoilpiridina. De fato, estudos de relação estrutura-atividade (SAR) mostraram que, para esta classe de ligantes, valores menores de $\log P$ contribuem para uma maior atividade citotóxica. Além disso, estudos SAR mostram que outros fatores podem estar relacionados com a maior atividade das hidrazonas

⁷ J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Da Silva, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5671.

⁸ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

derivadas de 2-acetilpiridina, tais como a área de superfície e o momento dipolo dos compostos. Em ambos os casos, correlações inversas entre os parâmetros e a atividade foram observadas.

Os resultados aqui apresentados sugerem que as hidrazonas podem ser consideradas bons candidatos a fármacos para o tratamento de tumores cerebrais.

Levando-se em consideração a importância do metabolismo de ferro em parasitas responsáveis pela malária, as similaridades entre os íons ferro(III) e gálio(III) e a atividade antimalárica relatada para hidrazonas^{9,10}, a ação antimalárica *in vitro* das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III) foi determinada. Os resultados mostraram que todos os compostos testados foram altamente ativos contra *P. falciparum*. No entanto, considerando que cada molécula de complexo possui duas moléculas de hidrazona, a complexação não melhorou significativamente a atividade antimalárica das hidrazonas. Além disso, a coordenação ao gálio(III) resultou em um aumento da toxicidade, indicando que a coordenação não foi uma boa estratégia para redução da dose. Por outro lado, as hidrazonas testadas foram altamente ativas e seletivas, destacando-se H2AcPNO₂Ph com índice de seletividade igual a 5312. Desta forma, as hidrazonas testadas podem ser consideradas potenciais agentes antimaláricos.

Lapachol é uma naftoquinona com amplo perfil farmacológico que apresenta, entre outras, atividade anti-inflamatória¹¹. No entanto, o composto mostra toxidez apreciável. Desse modo, a preparação de complexos metálicos de lapachol poderia constituir uma estratégia de melhorar seus efeitos farmacológicos e diminuir sua toxidez.

Estudos revelam que os íons gálio(III) e bismuto(III) apresentam um potencial terapêutico contra diferentes doenças relacionadas com processos inflamatórios.¹² Assim, sínteses de complexos de gálio(III) e bismuto(III) com lapachol foram realizadas, obtendo-se os complexos [Ga(Lp)₃]H₂O e [Bi(Lp)₂]Cl. Os complexos foram avaliados em modelos animais de angiogênese inflamatória.

Os resultados obtidos para o tratamento *per os* utilizando doses de lapachol de 25 mg/Kg/dia (e doses equivalentes dos demais compostos) mostraram que apenas o complexo de bismuto [Bi(Lp)₂]Cl reduziu estatisticamente a quantidade de hemoglobina nos implantes. Por outro lado, após administração intraperitoneal (i.p.), tanto o lapachol quanto seu complexo de

⁹ S.E. Harpstrite, A.A. Beatty, S.D. Collins, A. Oksman, D.E. Goldberg, V. Sharma, Inorg. Chem. 42 (2003) 2294.

¹⁰ P. Melnyk, V. Leroux, C. Sergheraert, P. Grellier, Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 31.

¹¹ E.R. De Almeida, A.A. Da Silva Filho, E.R. Dos Santos, C.A.C. Lopes, J. Ethnopharmacol. 29 (1990) 239.

¹² V. Matkovic, A. Balboa, D. Clinchot, C. Whitacre, B. Zwillig, D. Brown, S.E. Weisbrode, G. Apseloff, N. Gerber, Curr. Ther. Res. 50 (1991) 255.

bismuto reduziram estatisticamente a neovascularização dos implantes. Estes resultados indicam que ambos, lapachol e complexo de bismuto, apresentam propriedades anti-inflamatórias e antiangiogênicas.

Da mesma forma, a atividade da enzima *N*-acetilglicosaminidase (NAG, componente inflamatório) nos implantes foi estatisticamente reduzida pelo complexo de bismuto(III) no tratamento *per os*, enquanto no tratamento i.p. a inibição da atividade foi observada pelo lapachol e o complexo [Bi(Lp)₂]Cl.

Comparando-se os tratamentos *per os* e i.p., pode-se propor que a discrepância entre os resultados é decorrente de modelos de administração distintos. Visto que no tratamento i.p. nenhuma diferença estatística foi verificada entre os grupos lapachol e [Bi(Lp)₂]Cl e que a administração *per os* compreende um maior número de variáveis que podem interferir na absorção e biodisponibilidade dos compostos, é razoável sugerir que a atividade do complexo [Bi(Lp)₂]Cl é atribuída ao ligante lapachol. Desta forma, a coordenação ao bismuto mostrou-se uma boa estratégia para melhorar os efeitos terapêuticos do lapachol após a administração *per os*. Por sua vez, a coordenação ao gálio(III) não foi uma boa estratégia, visto que a complexação inibiu o efeito antiangiogênico do lapachol.

Uma redução de dose para 2,5 mg/Kg/dia de lapachol resultou no desaparecimento da atividade antiangiogênica dos compostos, sugerindo que a atividade é dependente da dose utilizada.

Poucos relatos são verificados para compostos contendo tiossemicarbazonas com substituintes na posição *orto* do grupo *N*(4)-fenil. Assim, o perfil farmacológico de

2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -clorofenil	tiossemicarbazona	(H2Ac4oClPh),
2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -fluorfenil	tiossemicarbazona	(H2Ac4oFPh),
2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -nitrofenil	tiossemicarbazona	(H2Ac4oNO ₂ Ph),
2-benzoilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -clorofenil	tiossemicarbazona	(H2Bz4oClPh),
2-benzoilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -fluorfenil	tiossemicarbazona	(H2Bz4oFPh) e
2-benzoilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -nitrofenil	tiossemicarbazona	(H2Bz4oNO ₂ Ph) foi investigado.

Em razão da atividade antichagásica e anti-*Leishmania* de compostos da família das tiossemicarbazonas¹³ obtivemos complexos de antimônio(III) de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas *N*(4)-*orto*-fenil substituídas. De fato, o principal uso clínico de antimoniais é no tratamento de *leishmanioses*. No entanto, as similaridades bioquímicas entre

¹³ M.E. Caputto, L.E. Fabian, D. Benítez, A. Merlino, N. Ríos, H. Cerecetto, G.Y. Moltrasio, A.G. Moglioni, M. González, L.M. Finkielstein, Bioorg. Med. Chem. 19 (2011) 6818.

Trypanosoma cruzi e *Leishmania*¹⁴ justificam testar tanto o efeito anti-*Leishmania* quanto a atividade anti-*T. cruzi* de complexos de antimônio(III), como realizado no presente trabalho.

Os complexos de antimônio(III) [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂], [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂], [Sb(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂], [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂], [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂] e [Sb(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] foram obtidos e devidamente caracterizados. Estruturas cristalográficas de [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] e [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] foram determinadas, confirmando a presença de complexos neutros.

Os resultados obtidos revelaram que tanto as tiossemicarbazonas como seus complexos de antimônio(III) apresentaram significativa atividade antipromastigota contra *Leishmania major*, com valores de IC₅₀ inferiores ao do glucantime, fármaco de primeira escolha no Brasil.

A coordenação das tiossemicarbazonas ao antimônio(III) resultou em um aumento significativo da atividade apenas no caso do ligante H2Ac4oFPh (IC₅₀ = 19,4 μmol L⁻¹) e seu complexo [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (IC₅₀ = 8,5 μmol L⁻¹). Estes resultados poderiam sugerir que, de forma geral, a complexação não foi uma boa estratégia na busca por novos leishmanicidas. No entanto, um estudo da citotoxicidade dos compostos foi realizado através do ensaio de liberação de lactato desidrogenase e a determinação do índice terapêutico dos compostos revelou que os melhores protótipos são os complexos [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (IT = 11,8) e [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] (IT = 13,5).

Com o intuito de avaliar a influência de algumas propriedades físico-químicas dos compostos na atividade leishmanicida, uma investigação da relação estrutura-atividade foi realizada para as tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III). Porém, nenhuma correlação foi verificada entre as propriedades avaliadas e a atividade leishmanicida dos compostos.

Os compostos estudados foram altamente ativos contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* testada, apresentando atividade antichagásica superior à do fármaco de referência nifurtimox.

A complexação com antimônio(III) mostrou-se interessante no caso dos complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] e [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂], os quais foram mais ativos que suas respectivas tiossemicarbazonas. A mudança mais notória foi verificada para [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂]. Além disso, os resultados obtidos revelam que H2Bz4oClPh e os complexos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] e [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] são os compostos mais ativos, inibindo 55 a 70 vezes mais o crescimento de *T. cruzi* que o nifurtimox. Porém, o índice terapêutico dos complexos é relativamente pequeno

¹⁴ F.R. Opperdoes, J.-P. Szikora, Mol. Biochem. Parasitol. 147 (2006) 193.

(IT = 14,36 para $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ e IT = 16,27 para $[\text{Sb}(\text{2Bz4oClPh})\text{Cl}_2]$), enquanto H2Bz4oClPh possui um alto índice terapêutico (IT = 1239,1), tornando-o um potencial agente antichagásico.

Finalmente, uma comparação da citotoxicidade das tiossemicarbazonas *orto*-substituídas com as suas correspondentes tiossemicarbazonas não-substituídas testadas por outros pesquisadores de nossa equipe¹⁵ revelou que a substituição reduziu significativamente a citotoxicidade dessa classe de moléculas. Assim, a presença dos substituintes na posição *orto* do anel fenílico foi uma estratégia interessante para diminuição da citotoxicidade e aumento do índice terapêutico dos compostos.

Estudos SAR foram realizados para avaliar a influência de algumas propriedades físico-químicas dos compostos em sua atividade antichagásica, porém nenhuma correlação foi observada. A falta de correlação pode ser devida à pequena diferença nos valores de atividade dos compostos. Por outro lado, correlações foram obtidas entre as citotoxicidades dos compostos e suas propriedades físico-químicas. Considerando-se apenas os isômeros *E* das tiossemicarbazonas, observa-se uma correlação direta entre o momento dipolo e a citotoxicidade, indicando que moléculas com momentos dipolo menores tendem a ser menos citotóxicas. De fato, o isômero *E* de $\text{H2Ac4oNO}_2\text{Ph}$ apresenta o menor momento dipolo, juntamente com a menor citotoxicidade, entre as tiossemicarbazonas. Para os isômeros *Z* das tiossemicarbazonas foram observadas correlações diretas entre a energia de HOMO e a citotoxicidade, entre a energia de LUMO e a citotoxicidade e entre o momento dipolo e a citotoxicidade. Por sua vez, considerando-se apenas as espécies majoritárias, observa-se a existência de correlação direta entre a energia de HOMO e a citotoxicidade e entre a energia de LUMO e a citotoxicidade. Desta forma, compostos mais reativos resultam em uma maior citotoxicidade. Analisando-se os complexos de antimônio(III), uma correlação inversa entre as energias de HOMO e a citotoxicidade dos complexos foi encontrada. Estes resultados são condizentes com o observado, onde $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ apresentam os menores valores de energia de HOMO e as maiores citotoxicidades entre os complexos.

A mesma família de tiossemicarbazonas foi complexada ao estanho(IV) no intuito de se obter compostos que reuniram as propriedades antimicrobianas dos ligantes e do metal. Compostos de estanho são conhecidos por suas diversas bioatividades e alguns são

¹⁵ 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.

industrializados e usados como biocidas¹⁶. No entanto, sua elevada toxidez justifica a procura por derivados menos tóxicos. Muitos estudos com compostos de estanho apresentam relações entre a estrutura desses compostos e suas atividades farmacológicas. De forma geral, os resultados mostram que a toxicidade de organoestânicos está diretamente relacionada com o número de grupos orgânicos coordenados ao metal.¹⁶ Desta forma, compostos com um menor número de grupos orgânicos tendem a apresentar menor toxidez. Foram, então, obtidos os complexos $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{ClPh})\text{Cl}_2]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{FPh})\text{Cl}_2]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{ClPh})\text{Cl}_2]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{FPh})\text{Cl}_2]$ e $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$, onde o ligante encontra-se coordenado na forma aniônica.

As tiossemicarbazonas e seus complexos de estanho(IV) mostraram alta atividade contra todas as espécies de *Candida* testadas. Em alguns casos, a atividade antifúngica dos compostos foi similar ou superior à atividade verificada pelo fármaco fluconazol.

De forma geral, as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina foram mais ativas que suas correspondentes tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina, destacando-se $\text{H}2\text{Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph}$, a qual exibiu a maior atividade contra as espécies de fungos testadas.

Embora o sal de estanho $[(n\text{-Bu})\text{SnCl}_3]$ tenha sido inativo, em alguns casos a coordenação resultou em aumento da atividade antifúngica. O melhor resultado foi verificado para o complexo $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4o\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$, onde a coordenação de $\text{H}2\text{Bz}4o\text{NO}_2\text{Ph}$ ao estanho(IV) aumentou em três vezes a atividade contra *C. albicans* e *C. krusei* e em seis vezes a atividade contra *C. glabrata* e *C. Parapsilosis*.

Estudos SAR sugerem a existência de uma correlação inversa entre o momento dipolo e a atividade das tiossemicarbazonas contra todas as espécies de fungos testadas. Realmente, a hidrazona com maior atividade antifúngica, $\text{H}2\text{Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph}$, possui o menor valor de momento dipolo, estando de acordo com os resultados *in silico*. Além disso, uma correlação inversa também foi verificada entre a energia de HOMO e a atividade antifúngica dos complexos de estanho, onde os complexos com maior atividade apresentam menor energia de HOMO.

Este trabalho apresenta uma diversidade de compostos desenvolvidos de acordo com o perfil farmacológico desejado. Novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos foram desenvolvidos por meio de diferentes estratégias, procurando-se ampliar o arsenal terapêutico para a o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas, doenças de origem

¹⁶ A.G. Davies, M. Gielen, K.H. Pannell, E.R.T. Tiekink (2008) Tin Chemistry: Fundamentals, Frontiers, and Applications. Wiley, West Sussex.

microbiana, inflamação e doenças degenerativas como o câncer. Os resultados desse trabalho possibilitaram a publicação de seis artigos (ver Anexo).

Anexo: Artigos aceitos e publicados



Original article

Pyridine-derived thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes with antifungal activity against *Candida* spp.

Gabrieli L. Parrilha^a, Jeferson G. da Silva^a, Ludmila F. Gouveia^b, Alan K. Gasparoto^b, Roberta P. Dias^a, Willian R. Rocha^a, Daniel A. Santos^b, Nivaldo L. Speziali^c, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, 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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2010

Received in revised form

18 January 2011

Accepted 25 January 2011

Available online 25 February 2011

Keywords:

Thiosemicarbazones

Tin(IV) complexes

Antifungal activity

SAR studies

ABSTRACT

[(*n*-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**), [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oFPh)Cl₂] (**5**) and [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**) were obtained by reacting [(*n*-Bu)SnCl₃] with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*chlorophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*fluorophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4oFPh), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-nitrophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4oNO₂Ph), and with the corresponding 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones (H2Bz4oClPh, H2ABz4oFPh and H2Bz4oNO₂Ph). The antifungal activity of the studied compounds was evaluated against several *Candida* species.

Upon coordination of H2Bz4oNO₂Ph to tin in complex (**6**) the antifungal activity increased three times against *Candida albicans* and *Candida krusei* and six times against *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of H2Ac4oNO₂Ph and its complex (**3**) against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* are similar to that of fluconazole. All studied compounds were more active than fluconazole against *C. krusei*.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Various fungal species are pathogenic and cause severe damage to plants and animals. Owing to the emergence and diversity of drug-resistant strains, the demand for novel antifungals has increased markedly in recent years [1].

Candida species, mainly *Candida albicans* can live as commensal microorganism in healthy individuals, but it is capable of causing infection if there are predisposing conditions related to the host, such as organ transplant, chemotherapy, diabetes, central nervous system diseases and AIDS. The leading fungal pathogen of humans is *C. albicans*, which ranks as the fourth most common cause of hospital acquired infectious disease and is associated with mortality rates approaching 50% [1–3]. Other species, such as *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* have increased their incidence in the last decades and these organisms are considered emerging pathogenic yeasts [4]. The intrinsic resistance of *C. krusei* to azole antifungals and decreased susceptibility of *C. glabrata* also became apparent during the early studies and use of these drugs [5]. *Candida*

parapsilosis is an opportunistic pathogen that colonizes human skin and can spread through hand carriage, causing multifaceted pathology in immuno-compromised and normal hosts, notably in low weight neonates [6,7].

Thiosemicarbazones and their metal complexes represent an interesting class of compounds with a wide range of pharmacological applications [8]. Many examples of this class of compounds have been evaluated over the last 50 years as having antitumor [9,10], antiviral [11,12], antiprotozoal [13,14], antibacterial [15,16] and antifungal [15,17] activities. In many cases upon coordination to metal ions, the bioactivity of these compounds increases, suggesting that complexation can be an interesting strategy of dose reduction [18–22].

Tin compounds are well-known for their innumerable applications as cytotoxic [23], biocidal [24], antibacterial [25] and antifungal agents [26], but are often very toxic. Therefore, the syntheses of tin complexes with thiosemicarbazones could be a strategy of preparation of new compounds with promising pharmacological profile. In fact, we demonstrated that tin(IV) complexes with 2-pyridineformamide thiosemicarbazones [21,27] showed higher antifungal activity than their free thiosemicarbazones.

In the present work *n*-butyltin(IV) complexes were obtained by reacting [(*n*-Bu)SnCl₃] with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*chlorophenyl

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5740; fax: +55 31 3409 5700.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

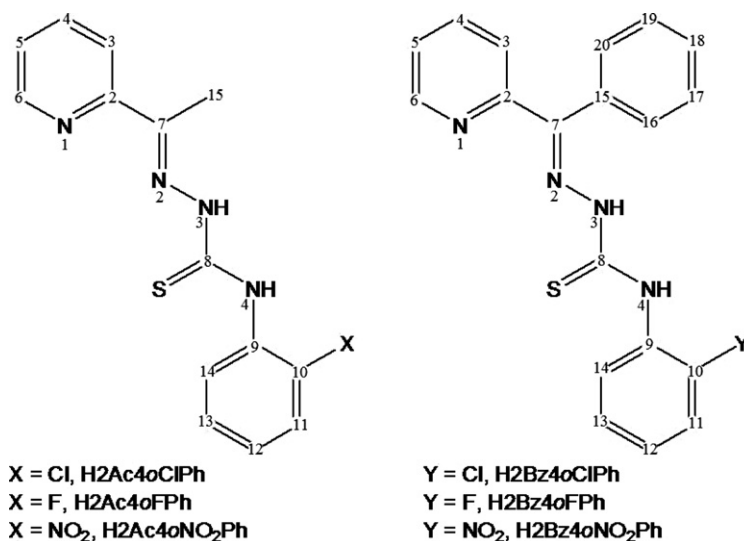


Fig. 1. Structural representation of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones.

thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh) and its *N*(4)-orthofluorophenyl (H2Ac4oFPh) and *N*(4)-orthonitrophenyl (H2Ac4oNO₂Ph) analogs, together with the corresponding 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones (H2Bz4oClPh, H2Bz4oFPh and H2Bz4oNO₂Ph) (Fig. 1). The antimicrobial activities of the thiosemicarbazones and their organotin(IV) complexes were evaluated against *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*.

2. Chemistry

2.1. Synthesis of 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthofluorophenyl thiosemicarbazone (H2Bz4oFPh) and 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthonitrophenyl thiosemicarbazone (H2Bz4oNO₂Ph)

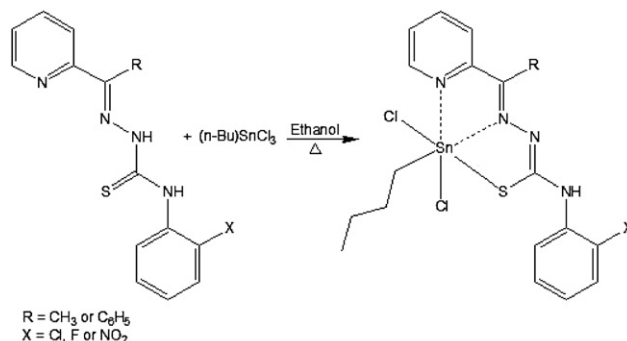
2-Acetylpyridine-*N*(4)-orthochlorophenyl thiosemicarbazone, its *N*(4)-orthofluorophenyl and *N*(4)-orthonitrophenyl analogs and 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthochlorophenyl thiosemicarbazone were prepared as previously described [28,29]. 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthofluorophenyl and 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthonitrophenyl thiosemicarbazones were prepared by mixing an excess of N₂H₄·H₂O (30%) with the appropriate *o*-chlorophenyl-, *o*-fluorophenyl- or *o*-nitrophenylisothiocyanate. The thiosemicarbazides obtained were reacted with 2-benzoylpyridine in methanol with addition of 2–4 drops of concentrated sulfuric acid as catalyst. The reaction mixture was kept under reflux for 6–7 h. The resulting solids were filtered off, washed with methanol and ether and dried *in vacuo*.

2.1.1. 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthofluorophenyl thiosemicarbazone (H2Bz4oFPh)

Yellow solid. C₁₉H₁₅N₄SF (350.41) Melt point: 156.0–158.0 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(NH) 3311, ν(CN) 1618, ν(CS) 784, ρ(py) 614. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm) = 13.26 (*Z*), 10.46 (*E*) [1H, N(3)H (*Z* and *E* isomers)], 10.24 (*Z*), 9.22 (*E*) [1H, N(4)H (*Z* and *E* isomers)], 8.88 (*Z*), 8.48 (*E*) [1H, H6 (*Z* and *E* isomers)], 7.71 (*Z*) [1H, H3 (*Z* isomer)], 7.59–7.65 [1H, H5 (*Z* isomer)], 8.04 (*Z*), 7.91 (*E*) [1H, H4 (*Z* isomer)]. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 177.58 (*Z*) [C8 (*Z* isomer)], 151.18 (*Z*), [C2 (*Z* isomer)], 148.76 (*Z*), [C6 (*Z* isomer)], 144.01 (*Z*) [C7 (*Z* isomer)], 138.12 [C4 (*Z* isomer)], 126.17 [C5 (*Z* isomer)], 124.96 [C3 (*Z* isomer)]. Yield 67%.

2.1.2. 2-benzoylpyridine-*N*(4)-orthonitrophenyl thiosemicarbazone (H2Bz4oNO₂Ph)

Yellow solid. C₁₉H₁₅N₅O₂S (377.42) Melt point: 155.2–155.8 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(NH) 3267, ν(CN) 1606, ν(CS) 797, ρ(py) 630. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm) = 13.51 (*Z*) [1H, N(3)H (*Z* isomer)], 11.18 (*Z*), 9.59 (*E*) [1H, N(4)H (*Z* and *E* isomers)], 8.90 (*Z*), 8.56 (*E*) [1H, H6 (*Z* and *E* isomers)], 8.32 (*Z*), 8.50 (*E*) [1H, H3 (*Z* and *E* isomers)], 8.05 [1H, H5 (*Z* isomer)], 7.78 (*Z*) [1H, H4 (*Z* isomer)]. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 176.20 (*Z*) [C8 (*Z* isomer)], 151.08 (*Z*) [C2 (*Z* isomer)], 148.78 (*Z*) [C6 (*Z* isomer)], 144.54 (*Z*) [C7 (*Z* isomer)], 138.21 (*Z*) [C4 (*Z* isomer)], 125.16 (*Z*) [C5 (*Z* isomer)], 124.99 (*Z*) [C3 (*Z* isomer)]. Yield 89%.



Scheme 1. Synthesis of the tin(IV) complexes with thiosemicarbazones.

2.2. Synthesis of the tin(IV) complexes $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**5**) and $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**)

The tin(IV) complexes were obtained by stirring under reflux an ethanol solution of the desired ligand (1.0 mmol) with an equimolar amount of $[(n\text{-Bu})\text{SnCl}_3]$ for 7 h (see Scheme 1). The solids were washed with ethanol, diethylether and then dried *in vacuo*. Crystals of $\text{H}2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph}$ and of complexes (**1–4**) and (**6**) suitable for X-ray diffraction were obtained by crystallization from DMSO.

2.2.1. $[n\text{-butyl-dichloro}(2\text{-acetylpyridine-}N(4)\text{-orthochlorophenylthiosemicarbazonato})\text{tin(IV)}]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**)

Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{Cl}_3\text{SSn}$ (550.52): C, 39.27; H, 3.84; N, 10.18. Found: C, 39.31; H, 3.87; N, 10.07%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMF): $6.51 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Melt point: 238.6–240.7 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{CN})$ 1609, $\nu(\text{CS})$ 758, $\rho(\text{py})$ 651. (Csl/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ 533, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imine}})$ 444, $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ 330, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ 294, $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ 261. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.24 (1H, N(4)H), 8.91 (1H, H6), 8.45 (1H, H3), 8.35 (1H, H4), 7.94 (1H, H5). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.26 (C8), 144.71 (C6), 144.40 (C2), 143.03 (C4), 142.41 (C7), 129.64 (C5), 129.05 (C3). ¹¹⁹Sn NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = -347. ¹J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 945.8 Hz; ²J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 52.6 Hz; ³J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 163.4 Hz. Yield 85%.

2.2.2. $[n\text{-butyl-dichloro}(2\text{-acetylpyridine-}N(4)\text{-orthofluorophenylthiosemicarbazonato})\text{tin(IV)}]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**)

Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{Cl}_2\text{FSSn}$ (534.07): C, 40.48; H, 3.96; N, 10.49. Found: C, 40.49; H, 3.99; N, 10.37%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMF): $6.86 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Melt point: 130.8–133.8 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{CN})$ 1613, $\nu(\text{CS})$ 758, $\rho(\text{py})$ 650. (Csl/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ 526, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imine}})$ 463, $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ 340, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ 258, $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ 229. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.27 (1H, N(4)H), 8.91 (1H, H6), 8.46 (1H, H3), 8.37 (1H, H4), 7.94 (1H, H5). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 169.69 (C8), 153.19 (C2), 144.78 (C6), 143.08 (C4), 142.37 (C7), 127.52 (C5), 127.37 (C3). ¹¹⁹Sn NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = -347. ¹J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 946.1 Hz; ²J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 52.2 Hz; ³J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 163.8 Hz. Yield 79%.

2.2.3. $[n\text{-butyl-dichloro}(2\text{-acetylpyridine-}N(4)\text{-orthonitrophenylthiosemicarbazonato})\text{tin(IV)}]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**)

Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl}_2\text{SSn}$ (561.07): C, 38.53; H, 3.77; N, 12.48. Found: C, 38.61; H, 3.71; N, 12.39%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMF): $5.74 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Melt point: 239.8–240.6 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{CN})$ 1598, $\nu(\text{CS})$ 745, $\rho(\text{py})$ 651. (Csl/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ 575, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imine}})$ 432, $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ 353, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ 327, $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ 269. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.71 (1H, N(4)H), 8.93 (1H, H6), 8.46 (1H, H3), 8.40 (1H, H4), 7.97 (1H, H5). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 168.40 (C8), 146.23 (C2), 144.83 (C6), 143.16 (C4), 142.13 (C7), 126.88 (C5), 126.01 (C3). ¹¹⁹Sn NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = -348. ¹J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 946.6 Hz; ²J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 53.9 Hz; ³J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 161.0 Hz. Yield 92%.

2.2.4. $[n\text{-butyl-dichloro}(2\text{-benzoylpyridine-}N(4)\text{-orthochlorophenylthiosemicarbazonato})\text{tin(IV)}]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**)

Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{Cl}_3\text{SSn}$ (612.59): C, 45.09; H, 3.78; N, 9.15. Found: C, 45.06; H, 3.73; N, 8.79%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMF): $9.68 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Melt point: 227.5–231.5 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{CN})$ 1592, $\nu(\text{CS})$ 766, $\rho(\text{py})$ 637. (Csl/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ 533, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imine}})$ 444, $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ 330, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ 294, $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ 261. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.27 (1H, N(4)H), 9.01 (1H, H6), 8.30 (1H, H3), 7.95 (1H, H5), 7.65 (1H, H3). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.97 (C8), 143.26 (C2), 142.53 (C7), 145.26 (C6), 143.07 (C4), 129.39 (C5), 128.41 (C3). ¹¹⁹Sn NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = -343. ¹J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 934.9 Hz; ²J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 52.3 Hz; ³J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 162.2 Hz. Yield 91%.

(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 162.2 Hz. Yield 91%.

2.2.5. $[n\text{-butyl-dichloro}(2\text{-benzoylpyridine-}N(4)\text{-orthofluorophenylthiosemicarbazonato})\text{tin(IV)}]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**5**)

Orange solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{Cl}_2\text{FSSn}$ (596.14): C, 46.34; H, 3.89; N, 9.40. Found: C, 46.31; H, 3.99; N, 9.41%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMF): $5.03 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Melt point: 215.3–219.9 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{CN})$ 1617, $\nu(\text{CS})$ 753, $\rho(\text{py})$ 648. (Csl/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ 576, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imine}})$ 474, $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ 346, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ 268, $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ 244. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.31 (1H, N(4)H), 9.01 (1H, H6), 8.30 (1H, H3), 7.66 (1H, H4), 7.96 (1H, H5). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.27 (C8), 157.49 (C2), 145.31 (C6), 143.78 (C4), 142.48 (C7), 127.81 (C5), 127.11 (C3). ¹¹⁹Sn NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = -344. ¹J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 934.4 Hz; ²J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 52.1 Hz; ³J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 161.6 Hz. Yield 63%.

2.2.6. $[n\text{-butyl-dichloro}(2\text{-benzoylpyridine-}N(4)\text{-orthonitrophenylthiosemicarbazonato})\text{tin(IV)}]$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**)

Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl}_2\text{SSn}$ (623.14): C, 44.33; H, 3.72; N, 11.24. Found: C, 44.35; H, 3.69; N, 11.19%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMF): $7.50 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Melt point: 225.1–226.2 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{CN})$ 1604, $\nu(\text{CS})$ 745, $\rho(\text{py})$ 650. (Csl/nujol, cm⁻¹): $\nu(\text{Sn}-\text{C})$ 547, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{imine}})$ 427, $\nu(\text{Sn}-\text{S})$ 347, $\nu(\text{Sn}-\text{N}_{\text{py}})$ 306, $\nu(\text{Sn}-\text{Cl})$ 270. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.54 (1H, N(4)H), 9.04 (1H, d, H6), 8.35 (1H, H4), 8.00 (1H, H3), 7.97 (1H, H5). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 169.59 (C8), 145.33 (C2), 145.46 (C6), 142.23 (C7), 143.33 (C4), 128.95 (C5), 128.50 (C3). ¹¹⁹Sn NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = -345. ¹J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 934.4 Hz; ²J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 54.1 Hz; ³J(¹³C–¹¹⁹Sn) (DMSO-*d*₆): 160.5 Hz. Yield 84%.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the tin(IV) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (**5**) and $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**), in which an anionic thiosemicarbazone is attached to the metal center and the remaining coordination sites are occupied by one *n*-butyl group and two chloride ions (see Fig. 2). Upon recrystallization of **2** in DMSO crystals of $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$, dmsO (**2a**) were obtained.

3.2. Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{N})$ at 1618–1582 cm⁻¹ in the infrared spectra of the free thiosemicarbazones shift to 1617–1592 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1–6**), in agreement with coordination of the azomethine nitrogen [18–23,27,30]. The $\nu(\text{CS})$ absorption which lays at 801–782 cm⁻¹ in the spectra of the ligands shifts to 766–745 cm⁻¹ in the spectra of **1–6**, indicating coordination of the sulfur. The 52–25 cm⁻¹ shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [27,30]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 630–595 cm⁻¹ in the spectra of the uncomplexed thiosemicarbazones shifts to 651–637 cm⁻¹ in

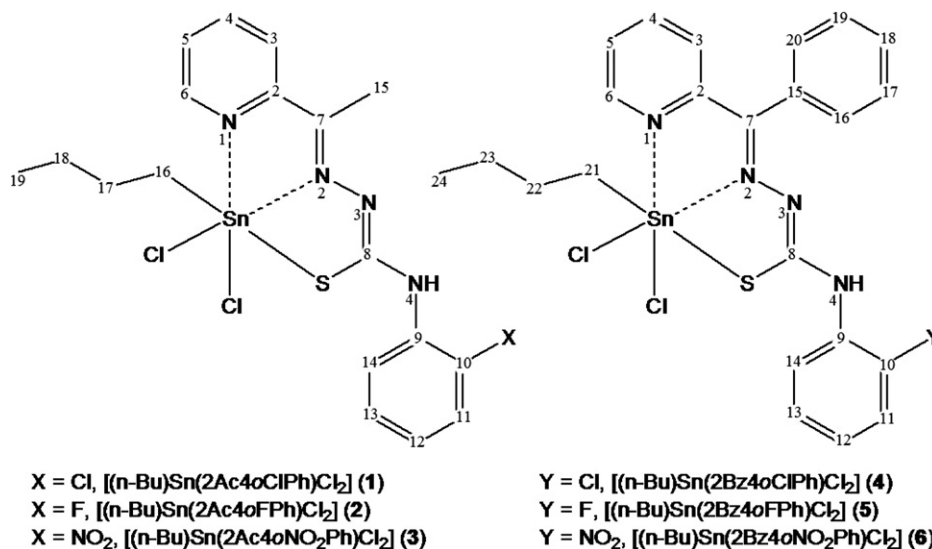


Fig. 2. Structural representation of [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (1), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂] (2), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (3), [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (4), [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oFPh)Cl₂] (5) and [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (6).

complexes (1–6), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [27,30].

In the spectra of 1–6 the absorptions at 576–526 cm⁻¹ were attributed to the ν (Sn–C) vibration mode and those at 474–427 cm⁻¹ to the ν (Sn–N_{imine}) stretching vibration [21]. Bands at 353–330 cm⁻¹ were attributed to ν (Sn–S), and the absorptions at 327–258 and 270–229 were attributed to the ν (Sn–N_{py}) and ν (Sn–Cl) modes, respectively [21,27,30].

Therefore, the thiosemicarbazones are attached to the metal through the N_{py}–N–S chelating system and chloride ions along with the *n*-butyl group occupy the remaining coordination positions.

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their organotin (IV) complexes were recorded in DMSO-*d*₆ because this is the only solvent which dissolves both ligands and complexes. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC). A ¹¹⁹Sn NMR study was performed for all complexes.

The signals of the hydrogens are duplicated in the ¹H NMR spectra of all 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 [20,30,31]. In the spectra of the 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones the signals of N3–H at δ 14.84–14.68 and at δ 11.18–10.90 ppm were attributed to the *Z* (7–5%) and *E* (93–95%) isomers respectively. These signals were found at δ 13.51–13.19 (*Z*, 79–85%) and at δ 10.53–10.44 ppm (*E*, 21–15%) in the spectra of the 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones. Only one signal was observed for each carbon in the spectra of the thiosemicarbazones due to the low solubility these compounds.

The signals of N(3)–H were absent in the spectra of complexes (1–6), indicating deprotonation of the –NHN= group on coordination. Upon coordination the signals of the pyridine hydrogens undergo significant shifts. Variations also occur in the ¹³C NMR spectrum for the signals of C=N, C=S and the pyridine carbons, in accordance with coordination through the N_{py}–N–S chelating system [21,27,30]. Hence in 1–6 the thiosemicarbazones adopt the

E configuration in relation to the C7–N2 bond, as confirmed by the crystal structures of complexes (1–4) and (6) (see Section 3.3). Signals of the *n*-butyl group were also found in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the complexes.

The coupling constants ¹J(¹³C–¹¹⁹J) of complexes (1–6) exhibited values of 934.4–946.6 Hz, while the values of ²J(¹³C–¹¹⁹J) and ³J(¹³C–¹¹⁹J) were 52.1–54.1 and 160.5–163.8 Hz, respectively. In all cases ²J < ³J as observed before for tin complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones [21].

The ¹¹⁹Sn NMR spectra of complexes 1–6 show only one signal in the δ = –(343–348) ppm range, compatible with the presence of one tin site. The positions of the ¹¹⁹Sn signals are in agreement with data reported in the literature for hexa-coordinated tin complexes [32]. These ¹¹⁹Sn chemical shifts are similar to that found for [(*n*-Bu)Sn(2Bz4Ph)Cl₂] (δ = –353 ppm; 2Bz4Ph = 2-benzoylpyridine thiosemicarbazonato) [33] which also contains an anionic tridentate thiosemicarbazone along with two chloride ions and one *n*-butyl group in the metal coordination sphere.

3.3. X-ray diffraction analysis

Figure 3 contains perspective views of [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (1), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂]-dmsO (2a) and [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (3). Fig. 4 contains perspective views of H2Bz4oNO₂Ph, [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (4) and [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (6). Crystal data and refinement results are listed in Table 1. The crystal structure of H2Ac4oClPh has been previously determined by some of us [34]. Tables 2 and 3 present selected intra-molecular bond distances and angles for H2Ac4oClPh [34], H2Bz4oNO₂Ph, and complexes (1–4) and (6).

The distances observed for H2Bz4oNO₂Ph are similar to those previously found for H2Ac4oClPh [34] (Table 2). In the latter there are two molecules per asymmetric unit. The C(8)–S(1) bond varies from 1.654(3) Å in H2Ac4oClPh [34] to 1.660(2) Å in H2Bz4oNO₂Ph and the C(7)–N(2) bond varies from 1.278(3) and 1.281(3) Å in H2Ac4oClPh [34] to 1.297(3) Å in H2Bz4oNO₂Ph. The N(2)–N(3), N(3)–C(8) and C(8)–N(4) bonds are 1.362(3) and 1.361(3) Å, 1.359(3) and 1.351(3) Å, and 1.328(4) and 1.336(3) Å in H2Ac4oClPh [34] and 1.358(2), 1.364(3), and 1.353(3) Å in H2Bz4oNO₂Ph. The bond angles of H2Ac4oClPh [34] and H2Bz4oNO₂Ph are also similar, but some differences were observed for the N(3)–C(8)–S(1) (121.0(2)

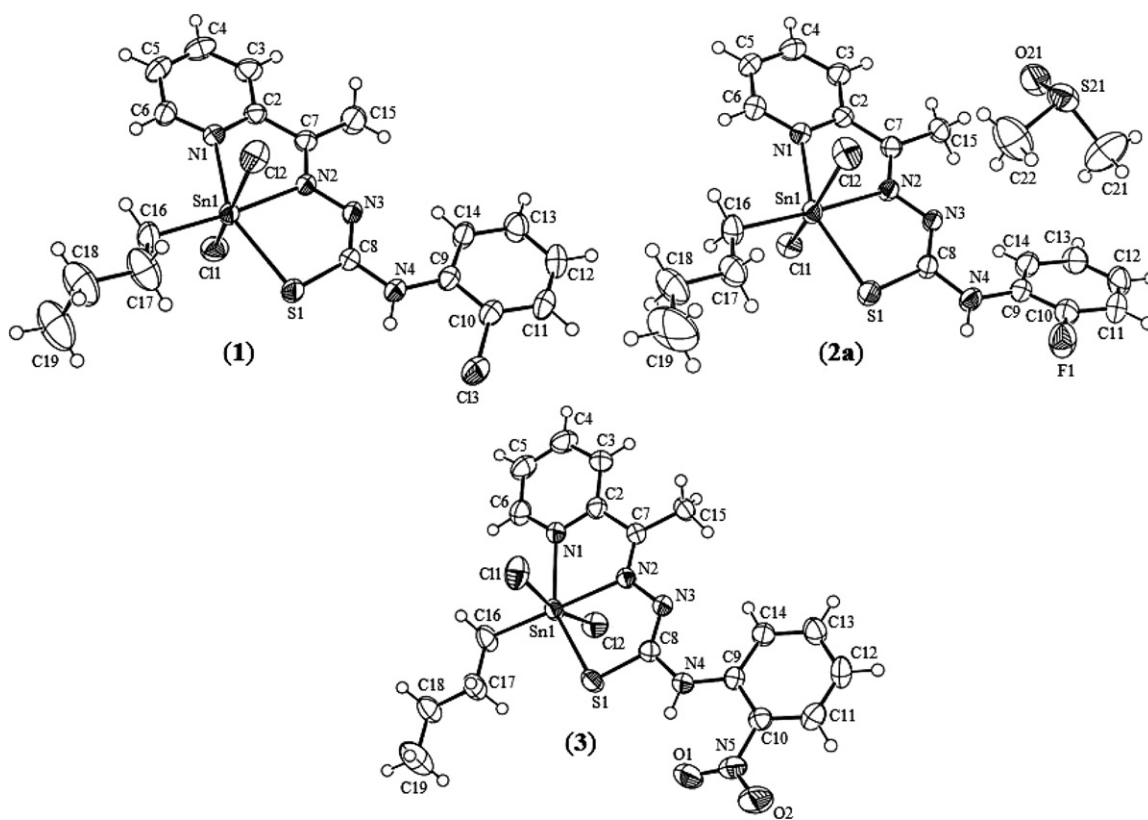


Fig. 3. Molecular plot of $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oFPh})\text{Cl}_2]\cdot\text{dmsO}$ (**2a**) and $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

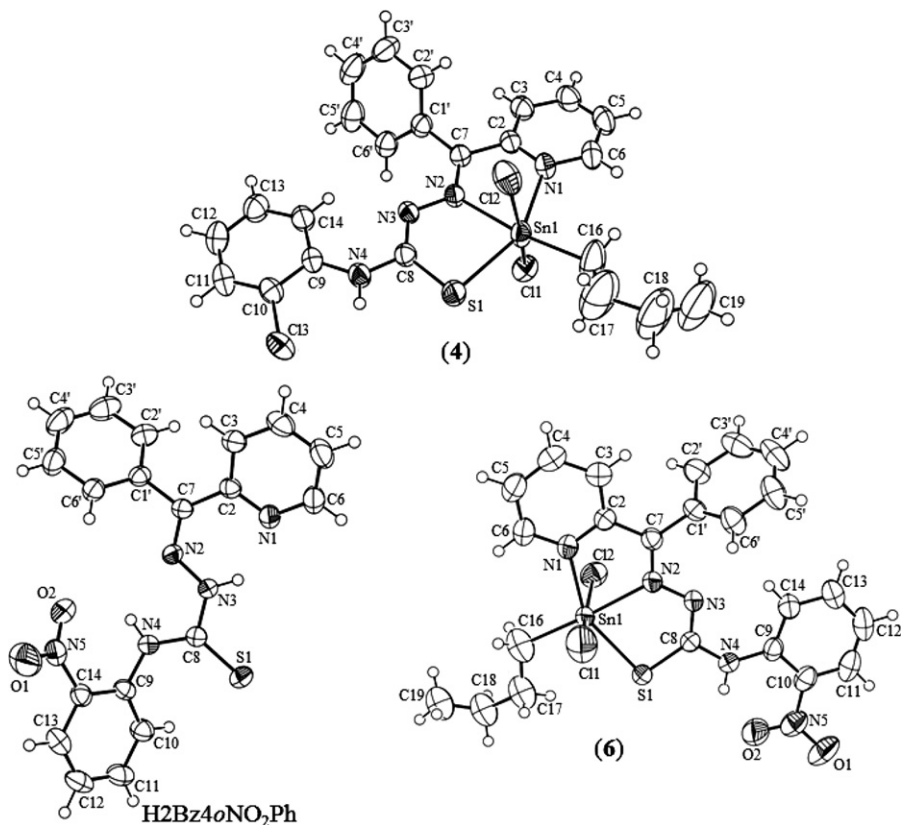


Fig. 4. Molecular plot of $\text{H}2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph}$, $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**) and $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(2\text{Bz}4\text{oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 1
Crystal data and refinement results for H2Bz4oNO₂Ph, [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂]-dmsO (**2a**), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**) and [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**).

Compound	H2Bz4oNO ₂ Ph	1	2a	3	4	6
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₂ S	C ₁₈ H ₂₁ Cl ₃ N ₄ SSn	C ₂₀ H ₂₇ Cl ₂ FN ₄ OS ₂ Sn	C ₁₈ H ₂₁ Cl ₂ N ₅ O ₂ SSn	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₃ N ₄ SSn	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₂ N ₅ O ₂ SSn
Formula weight	377.42	550.49	612.17	561.05	612.55	623.11
Crystal system	Orthorhombic	Monoclinic	Monoclinic	Triclinic	Triclinic	Orthorhombic
Space group	Pbca	<i>P</i> 21/ <i>c</i>	<i>P</i> 21/ <i>c</i>	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1	Pbca
Unit cell dimensions	a, Å	8.41960(10)	8.2713(3)	7.6909(3)	8.9112(2)	12.23330(10)
	b, Å	11.2272(2)	11.9709(3)	10.5923(4)	10.1381(2)	18.7376(2)
	c, Å	41.9318(17)	22.7845(4)	26.1990(8)	14.2098(5)	15.1284(3)
	α, °	90	90	90	87.128(3)	78.7360(10)
	β, °	90	92.541(2)	91.011(3)	85.354(3)	75.825(2)
	γ, °	90	90	90	73.447(3)	74.409(2)
Volume, Å ³	3571.0(3)	2151.67(6)	2593.69(14)	1105.53(7)	1264.03(5)	5195.26(10)
Z, Density calc., Mg/m ³	8, 1.404	4, 1.699	4, 1.568	2, 1.685	2, 1.609	8, 1.593
Absorption coefficient, mm ⁻¹	0.207	1.668	1.379	1.516	1.429	1.300
F(000)	1568	1096	1232	560	612	2496
Crystal size, mm	0.87 × 0.14 × 0.11	0.32 × 0.21 × 0.10	0.21 × 0.13 × 0.10	0.58 × 0.25 × 0.09	0.40 × 0.20 × 0.05	0.60 × 0.46 × 0.14
θ range for data coll.	4.22–26.37°	4.12–26.37°	4.13–26.37°	4.13–26.37°	4.21–26.37°	4.08–26.37°
Index range, θ	–13 ≤ <i>h</i> ≤ 13, –9 ≤ <i>k</i> ≤ 9, –52 ≤ <i>l</i> ≤ 52	–10 ≤ <i>h</i> ≤ 10, –13 ≤ <i>k</i> ≤ 14, 23 ≤ <i>l</i> ≤ 28	–10 ≤ <i>h</i> ≤ 10, –14 ≤ <i>k</i> ≤ 14, –32 ≤ <i>l</i> ≤ 32	–9 ≤ <i>h</i> ≤ 9, –12 ≤ <i>k</i> ≤ 13, –17 ≤ <i>l</i> ≤ 17	–11 ≤ <i>h</i> ≤ 11, –12 ≤ <i>k</i> ≤ 12, –18 ≤ <i>l</i> ≤ 18	–15 ≤ <i>h</i> ≤ 15, –23 ≤ <i>k</i> ≤ 23, –28 ≤ <i>l</i> ≤ 28
Absorption correction	Analytical [35]	Analytical [35]	Analytical [35]	Multi-scan [34]	Multi-scan [34]	Multi-scan [34]
Completeness, θ = 26.37°	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%
Max./min. transmission	0.980/0.911	0.866/0.675	0.891/0.804	1.000/0.805	1.000/0.766	1.000/0.573
Goodness-of-fit on F ²	1.056	1.030	0.954	0.999	1.047	1.100
Reflec. collect./unique (R _{int})	31652/3630 (0.0679)	16826/4381 (0.0531)	23141/5288 (0.0588)	8531/4507 (0.0379)	25937/5154 (0.0373)	106109/5296 (0.0419)
Data/restraints/parameters	3630/0/244	4381/0/245	5288/0/281	4507/0/263	5154/0/290	5296/0/290
Final R indices [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0465, wR ₂ = 0.1083	R ₁ = 0.0304, wR ₂ = 0.0781	R ₁ = 0.0289, wR ₂ = 0.0598	R ₁ = 0.0351, wR ₂ = 0.0859	R ₁ = 0.0301, wR ₂ = 0.0757	R ₁ = 0.0434, wR ₂ = 0.1055
R indices (all data)	R ₁ = 0.0705, wR ₂ = 0.1149	R ₁ = 0.0373, wR ₂ = 0.0807	R ₁ = 0.0446, wR ₂ = 0.0627	R ₁ = 0.0414, wR ₂ = 0.0885	R ₁ = 0.0378, wR ₂ = 0.0781	R ₁ = 0.0547, wR ₂ = 0.1132
Larg. peak & hole, e Å ⁻³	0.224/–0.217	0.605/–0.581	0.383/–0.340	0.424/–0.634	0.686/–0.586	1.184/–0.984

and 121.5(5)° in H2Ac4oClPh [34]; 118.09(15)° in H2Bz4oNO₂Ph and N(4)–C(8)–S(1) (124.3(2) and 124.1(2)° in H2Ac4oClPh [34]; 128.59(15)° in H2Bz4oNO₂Ph) bond angles (see Table 3).

H2Bz4oNO₂Ph crystallizes in the *ZE* conformation, which is stabilized by a hydrogen bond between N(3)–H and the hetero-aromatic nitrogen. A weak intra-molecular N(4)–H(4A)···O(2) hydrogen bond (see Table 4) is also present in the structure of H2Bz4oNO₂Ph.

The distances and angles in all complexes are similar. In all complexes tin(IV) is coordinated to a tridentate anionic ligand, together with the *n*-butyl group and two chloride ions *trans* to each other in a distorted octahedral environment. In complexes (**1–4**) and (**6**) the N(1)–Sn(1)–S(1) angle of *ca.* 149.90(9)–151.30(6)° deviates markedly from the ideal value of 180°, probably due to the spatial requirements of the ligand chelating system. By contrast, the Cl(1)–Sn(1)–Cl(2) and N(2)–Sn(1)–C(16) angles, which do not involve sterical hindrance, are in the 164.50(3)–167.13(3)° and 172.11(16)–178.27(10)° ranges, respectively (Table 3).

Table 2
Selected bond distances (Å) for H2Ac4oClPh [34], H2Bz4oNO₂Ph, [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂]-dmsO (**2a**), [(*n*-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**) and [(*n*-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**).

Atoms	H2Ac4oClPh ^a [34]	1	2a	3	4	H2Bz4oNO ₂ Ph	6
C(7)–N(2)	1.281(3)	1.278(3)	1.292(3)	1.294(3)	1.298(4)	1.297(3)	1.292(5)
N(2)–N(3)	1.362(3)	1.361(3)	1.367(3)	1.358(3)	1.374(3)	1.361(3)	1.360(5)
N(3)–C(8)	1.359(3)	1.351(3)	1.307(3)	1.317(3)	1.298(4)	1.308(3)	1.303(5)
C(8)–S(1)	1.654(3)	1.654(3)	1.742(3)	1.747(3)	1.749(3)	1.745(3)	1.740(4)
C(8)–N(4)	1.328(4)	1.336(3)	1.361(3)	1.348(3)	1.360(4)	1.362(3)	1.370(5)
Sn(1)–N(1)	–	–	2.245(2)	2.261(2)	2.243(2)	2.244(2)	2.248(4)
Sn(1)–N(2)	–	–	2.222(2)	2.209(2)	2.228(2)	2.231(2)	2.241(3)
Sn(1)–S(1)	–	–	2.4843(7)	2.4739(7)	2.4848(8)	2.4761(8)	2.4863(13)
Sn(1)–Cl(1)	–	–	2.5072(8)	2.5260(7)	2.5025(9)	2.4818(8)	2.4693(16)
Sn(1)–Cl(2)	–	–	2.5019(8)	2.4681(8)	2.4807(8)	2.5167(9)	2.4818(13)
Sn(1)–C(16)	–	–	2.133(3)	2.137(3)	2.142(3)	2.134(4)	2.150(6)

^a There are two molecules in the asymmetric unit.

A twisting of approximately 180° in the N(3)–C(8) bond of the thiosemicarbazone to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, the conformations change from *EE* in H2Ac4oClPh [34] and *ZE* in H2Bz4oNO₂Ph to *EZ* in the complexes. Hence some angles undergo significant changes on complexation. The N(2)–N(3)–C(8) angle goes from 118.2(2) and 118.9(2)° in H2Ac4oClPh [34] to 115.0(2)° in complex (**1**) and from 120.09(17)° in H2Bz4oNO₂Ph to 114.7(3)° in complex (**6**). N(4)–C(8)–S(1) varies from 124.3(2) and 124.1(2)° in H2Ac4oClPh [34] to 112.7(2)° in complex (**1**) and from 128.59(15)° in H2Bz4oNO₂Ph to 111.8(3)° in **6**.

The expected lengthening of the C(8)–S(1) bond from 1.654(3) Å in H2Ac4oClPh [34] to 1.742(3) Å in **1** and from 1.660(2) Å in H2Bz4oNO₂Ph to 1.740(4) Å in **6** was observed. The N(3)–C(8) bond varies from 1.359(3) and 1.351(3) Å in H2Ac4oClPh [34] to 1.307(3) Å in **1**, and from 1.364(3) Å in H2Bz4oNO₂Ph to 1.303(5) Å in **6**. 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

Table 3

Selected angles for H2Ac4oClPh [34], H2Bz4oNO₂Ph, [(n-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [(n-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂]·dmsO (**2a**), [(n-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [(n-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**) and [(n-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**).

Atoms	H2Ac4oClPh ^a [34]	1	2a	3	4	H2Bz4oNO ₂ Ph	6
C(7)–N(2)–N(3)	119.1(2)	118.7(2)	118.4(2)	118.4(2)	118.4(2)	120.0(2)	118.6(3)
N(2)–N(3)–C(8)	118.2(2)	118.9(2)	115.0(2)	115.4(2)	114.6(2)	115.5(2)	114.7(3)
N(3)–C(8)–S(1)	121.0(2)	121.5(2)	128.5(2)	128.08(19)	129.1(2)	129.0(2)	129.1(3)
N(3)–C(8)–N(4)	114.7(2)	114.4(2)	118.8(2)	118.2(2)	120.0(3)	118.9(2)	119.2(4)
N(4)–C(8)–S(1)	124.3(2)	124.1(2)	112.7(2)	113.69(18)	110.9(2)	112.0(2)	111.8(3)
N(1)–Sn(1)–N(2)	–	–	72.07(8)	72.58(7)	72.26(8)	72.42(8)	72.33(13)
N(1)–Sn(1)–S(1)	–	–	150.08(6)	151.30(6)	150.16(6)	151.22(6)	149.90(9)
N(1)–Sn(1)–Cl(1)	–	–	83.57(6)	81.64(6)	83.19(7)	84.18(6)	83.59(11)
N(1)–Sn(1)–Cl(2)	–	–	85.64(6)	84.83(6)	84.78(7)	85.86(6)	84.18(10)
N(1)–Sn(1)–C(16)	–	–	102.32(11)	104.14(10)	106.47(11)	99.81(15)	105.4(2)
N(2)–Sn(1)–S(1)	–	–	78.10(6)	78.85(5)	78.06(6)	78.82(6)	77.65(9)
N(2)–Sn(1)–Cl(1)	–	–	84.64(6)	84.60(6)	86.99(6)	85.55(6)	87.52(10)
N(2)–Sn(1)–Cl(2)	–	–	85.38(6)	84.16(6)	84.71(6)	82.91(6)	82.32(9)
N(2)–Sn(1)–C(16)	–	–	174.04(10)	176.70(9)	178.27(10)	172.11(16)	175.9(2)
S(1)–Sn(1)–Cl(1)	–	–	91.59(3)	93.19(3)	92.36(3)	92.68(3)	93.11(6)
S(1)–Sn(1)–Cl(2)	–	–	94.28(3)	95.07(3)	95.66(3)	91.74(3)	94.07(5)
S(1)–Sn(1)–C(16)	–	–	107.40(10)	104.40(8)	103.27(10)	108.97(14)	104.7(2)
Cl(1)–Sn(1)–Cl(2)	–	–	167.13(3)	164.50(3)	167.01(3)	166.60(3)	166.02(6)
Cl(1)–Sn(1)–C(16)	–	–	92.81(12)	94.61(8)	94.04(11)	95.20(16)	95.7(3)
Cl(2)–Sn(1)–C(16)	–	–	96.33(12)	96.00(9)	94.03(10)	95.30(17)	94.1(3)

^a There are two molecules in the asymmetric unit.

character due to deprotonation at N(3) and formation of a highly delocalized system [27,30,33].

In complexes (**1**–**4**) there is a slight shortening of the bond distance between tin and the imine nitrogen, 2.209(2)–2.231(2) Å, compared to the distance between tin and the hetero-aromatic nitrogen, 2.243(2)–2.261(2) Å. In complex (**6**) the bond distances between tin and the imine nitrogen (2.241(3) Å) and between tin the hetero-aromatic nitrogen (2.248(4) Å) are very close.

The molecular packing of complexes (**1**) and (**2**) reveal a number of weak intermolecular hydrogen bonds involving N(4)–H and Cl (in **1**) or O (in **2**) atoms with formation of molecular chains. In the other compounds only intra-molecular hydrogen bonds were evidenced.

3.4. In vitro antifungal activity

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the studied thiosemicarbazones, their organotin(IV) complexes and [(n-Bu)SnCl₃] against reference strains of *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* are reported in Table 5.

The thiosemicarbazones were active against all tested *Candida* species. The determined MIC values revealed that 2-acetylpyridine thiosemicarbazones are slightly more active than the corresponding 2-benzoylpyridine derivatives. MIC values for H2Ac4oNO₂Ph were the same against all fungal species, while the other

thiosemicarbazones were in general less active against *C. parapsilosis*. Interestingly, H2Ac4oFPh although less active against *C. parapsilosis* was more active against *C. glabrata*. Among the 2-acetylpyridine thiosemicarbazones H2Ac4oNO₂Ph exhibited the highest activity against all tested *Candida* species.

[(n-Bu)SnCl₃] proved to be inactive against all species. However, coordination of H2Bz4oNO₂Ph to the tin(IV) salt in complex (**6**) resulted in increased antifungal activity against all *Candida* species. Upon coordination to tin the antifungal activity increased three times against *C. albicans* and *C. krusei* and six times against *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. Similarly, coordination of H2Ac4oFPh with tin(IV) in complex (**2**) lead to increased activity against all species except for *C. krusei*. In addition, complexation of H2Bz4oFPh to tin(IV) resulted in higher activity against *C. albicans* in complex (**5**). These results suggest that the association of thiosemicarbazones and *n*-butyltin could be an interesting strategy for dose reduction. In the other cases coordination proved not to be effective.

The MIC values of H2Ac4oNO₂Ph and of complexes (**2**), (**3**) and (**6**) against *C. albicans* are close to that obtained for fluconazole, the drug used as positive control. Likewise, similar MIC values were obtained for fluconazole, H2Ac4oNO₂Ph, and complexes (**3**) and (**6**) against *C. parapsilosis*. H2Ac4oFPh, H2Ac4oNO₂Ph and **3** presented

Table 4

Hydrogen bond distances [Å] and angles [°] for H2Bz4oNO₂Ph, [(n-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [(n-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl₂]·dmsO (**2a**), [(n-Bu)Sn(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [(n-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**) and [(n-Bu)Sn(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**).

Compound	D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	(D–H...A)
H2Bz4oNO ₂ Ph	N(3)–H(3A)···N(1)	0.86	1.95	2.618(2)	133.1
1	N(4)–H(4A)···O(2)	0.86	2.16	2.668(2)	117.6
	N(4)–H(4A)···Cl(3)	0.86	2.48	2.933(2)	114.0
	N(4)–H(4A)···Cl(1) #1	0.86	2.88	3.592(3)	140.8
2a	N(4)–H(4A)···O(21) #2	0.86	1.90	2.751(3)	171.9
	N(4)–H(4)···O(1)	0.86	1.87	2.589(3)	139.8
3	N(4)–H(4)···N(5)	0.86	2.47	2.885(3)	110.7
	N(4)–H(4A)···Cl(3)	0.86	2.38	2.898(2)	119.5
4	N(4)–H(4)···N(5)	0.86	2.45	2.867(5)	110.5
	N(4)–H(4)···O(2)	0.86	1.92	2.625(5)	137.7

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: #1 –x, y – 1/2, –z + 1/2; #2 x – 1, y, z.

Table 5

Minimum inhibitory concentration (MIC, μM) against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones, their tin(IV) complexes, [(n-Bu)SnCl₃] and fluconazole.

Compound	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
H2Ac4oClPh	13.12	13.12	13.12	26.24
[(n-Bu)Sn(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	29.06	29.06	14.53	58.13
H2Ac4oFPh	13.87	13.87	6.94	27.74
[(n-Bu)Sn(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)	7.49	14.98	3.74	14.98
H2Ac4oNO ₂ Ph	6.34	6.34	6.34	6.34
[(n-Bu)Sn(2Ac4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (3)	7.13	7.13	7.13	7.13
H2Bz4oClPh	21.81	21.81	21.81	43.62
[(n-Bu)Sn(2Bz4oClPh)Cl ₂] (4)	26.12	26.12	26.12	52.24
H2Bz4oFPh	45.66	45.66	11.42	45.66
[(n-Bu)Sn(2Bz4oFPh)Cl ₂] (5)	26.84	53.68	13.42	107.4
H2Bz4oNO ₂ Ph	21.20	21.20	21.20	42.40
[(n-Bu)Sn(2Bz4oNO ₂ Ph)Cl ₂] (6)	6.42	6.42	3.21	6.42
[(n-Bu)SnCl ₃]	>907.3	>907.3	>907.3	>907.3
Fluconazole	6.53	104.5	6.53	6.53

Table 6
Calculated physico-chemical properties and experimental minimum inhibitory concentration (MIC) values for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes.

Compound	ϵ (HOMO) (u.a.) ^a	ϵ (LUMO) (u.a.)	Dipole (db)	MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
				<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
H2Ac4oClPh	−0.2035 (<i>E</i> isomer)	−0.0821 (<i>E</i> isomer)	3.120 (<i>E</i> isomer)	13.12	13.12	13.12	26.24
	−0.2033 (<i>Z</i> isomer)	−0.0704 (<i>Z</i> isomer)	5.700 (<i>Z</i> isomer)				
H2Ac4oFPh	−0.2026 (<i>E</i> isomer)	−0.0583 (<i>E</i> isomer)	2.843 (<i>E</i> isomer)	13.87	13.87	6.94	27.74
	−0.2015 (<i>Z</i> isomer)	−0.0693 (<i>Z</i> isomer)	5.874 (<i>Z</i> isomer)				
H2Ac4oNO ₂ Ph	−0.2101 (<i>E</i> isomer)	−0.1021 (<i>E</i> isomer)	0.513 (<i>E</i> isomer)	6.34	6.34	6.34	6.34
	−0.2091 (<i>Z</i> isomer)	−0.0891 (<i>Z</i> isomer)	4.279 (<i>Z</i> isomer)				
H2Bz4oClPh	−0.2018 (<i>E</i> isomer)	−0.0614 (<i>E</i> isomer)	3.187 (<i>E</i> isomer)	21.81	21.81	21.81	43.62
	−0.2041 (<i>Z</i> isomer)	−0.0725 (<i>Z</i> isomer)	5.581 (<i>Z</i> isomer)				
H2Bz4oFPh	−0.2010 (<i>E</i> isomer)	−0.0600 (<i>E</i> isomer)	3.440 (<i>E</i> isomer)	45.66	45.66	11.42	45.66
	−0.2024 (<i>Z</i> isomer)	−0.0715 (<i>Z</i> isomer)	5.588 (<i>Z</i> isomer)				
H2Bz4oNO ₂ Ph	−0.2079 (<i>E</i> isomer)	−0.0987 (<i>E</i> isomer)	1.846 (<i>E</i> isomer)	21.20	21.20	21.20	42.40
	−0.1989 (<i>Z</i> isomer)	−0.0543 (<i>Z</i> isomer)	6.162 (<i>Z</i> isomer)				
(1)	−0.2234	−0.1026	8.387	29.06	29.06	14.53	58.13
(2)	−0.2249	−0.0986	7.486	7.49	14.98	3.74	14.98
(3)	−0.2305	−0.1090	11.417	7.13	7.13	7.13	7.13
(4)	−0.2199	−0.1026	8.834	26.12	26.12	26.12	52.24
(5)	−0.2174	−0.1011	7.509	26.84	53.68	13.42	107.4
(6)	−0.2290	−0.1080	11.859	6.42	6.42	3.21	6.42

^a 1 u.a. = 27.211 eV; eV = 627.51 kcal/mol.

MIC values similar to that of fluconazole against *C. glabrata*, while complexes (2) and (6) proved to be twice more active than the positive control. All studied compounds presented higher activity than fluconazole against *C. krusei*.

Overall coordination to tin(IV) provided distinct effects on the 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones antifungal activities against the set of strains. Physico-chemical properties of the complexes as well as intrinsic differences between the studied *Candida* species may have influenced the antimicrobial activity.

In the 2-acetylpyridine series of ligands the presence of the nitro group seemed to favor activity, but this effect has not been observed in the 2-benzoylpyridine analogs. However, complex (6), containing the nitro derivative of the 2-benzoylpyridine series revealed to be the most active among all studied compounds.

The foregoing results suggest that pyridine-derived thiosemicarbazones and their organotin(IV) complexes should be further investigated as new antifungal drug candidates.

3.5. SAR studies

SAR theoretical calculations were performed in order to investigate physico-chemical properties that may be related to the antimicrobial action of the studied compounds. Properties of interest in this study were the highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies and the dipole moments, which were correlated to the determined MIC values. The HOMO and LUMO energies are related to ionization potential and electron affinity, respectively. These frontier orbitals are associated to the molecule's reactivity. HOMO energy is closely related to reactivity to electrophilic attack while LUMO energy is closely related to reactivity to nucleophilic attack. Additionally, the dipole moment may give some insight on the degree of hydrophobicity/hydrophilicity of the compounds.

The antimicrobial activity against strains of *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* and the physico-chemical parameters of the thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes are displayed in Table 6. Physico-chemical properties were obtained for the thiosemicarbazones' *E* and *Z* isomers and for the *E* isomer of the complexes.

H2Ac4oNO₂Ph was the most active thiosemicarbazone against all tested *Candida* species. According to Table 6, this thiosemicarbazone presents the lowest value of dipole moment. In

general HOMO and LUMO energies of all thiosemicarbazones were very close. Complexes (3) and (6), which presented the lowest values of HOMO energy among all tin(IV) complexes, showed the highest activity against the *Candida* species.

Attempting to establish some correlation between physico-chemical properties and antifungal activity, we built a simple correlation matrix (data not shown) for the thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes. For the thiosemicarbazones the possibility of existence of the *E* and *Z* isomers was considered. We found distinct correlations between physico-chemical properties and activities for the thiosemicarbazones and for their tin(IV) complexes.

Analyzing separately the *E* and *Z* isomers of the thiosemicarbazones, no correlation was observed. However, considering the major isomers (*E* isomer for H2Ac4oClPh, H2Ac4oFPh and H2Ac4oNO₂Ph and *Z* isomer for H2Bz4oClPh, H2Bz4oFPh and H2Bz4oNO₂Ph) there is an inverse correlation between the dipole moment and the activity against *C. albicans* ($R = -0.72$), *C. krusei* ($R = -0.72$), *C. glabrata* ($R = -0.80$) and *C. parapsilosis* ($R = -0.98$). Hence lower values of dipole moment contribute to higher antifungal activity.

Concerning the correlation between the properties and activities for the complexes, we found that there is an inverse correlation between the HOMO energy and the activity against all *Candida* species ($R = -0.83$ for *C. albicans*, $R = -0.91$ for *C. krusei*, $R = -0.69$ for *C. glabrata* and $R = -0.91$ for *C. parapsilosis*).

Thus the obtained results indicate that distinct physico-chemical properties influence the antifungal activity of the thiosemicarbazones and their tin(IV) complexes, suggesting that their mechanisms of antifungal activity are probably different.

4. Conclusions

The studied compounds proved to be active against several *Candida* species. In some cases the determined MIC values were similar to or lower than those obtained for fluconazole, suggesting that further investigation should be carried out on their antimicrobial profile. SAR studies suggested that there is an inverse correlation between the dipole moment and the activity of the thiosemicarbazones against the studied *Candida* species. Moreover, there is an inverse correlation between the HOMO energy and the antifungal activity of the tin(IV) complexes. The distinct behaviors of the thiosemicarbazones and their tin(IV)

complexes indicate that their modes of antifungal action are probably different.

5. Experimental protocols

5.1. Physical measurements

All starting reagents were purchased from Sigma–Aldrich and used without further purification. All other chemicals and solvents were of analytical grade. 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 as the solvent and TMS as internal reference.

5.2. X-ray crystallography

Crystal structure of H₂Bz₄O₂Ph, and complexes (**1–4**) and (**6**) were investigated using single-crystal X-ray diffractometry. The measurements were carried out on an Xcalibur Atlas Gemini ultradiffractometer with graphite monochromated Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) at 298(2) K. The data collection, cell refinements, and data reduction were performed using the CRYALISPRO software [35]. Absorption correction methods as described in Table 1 were applied [35,36]. The structures were solved using the softwares SHELXS-97 [37] for H₂Bz₄O₂Ph and complexes (**1–3**) and (**6**) or SIR-92 [38] for complex (**4**) and refined using the software SHELXL-97 [39]. Full-matrix least-squares refinement procedure on F² with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-97. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model. Tables were generated by WINGX [40]. Crystal data, data-collection parameters, and structure-refinement data are summarized in Table 1.

5.3. In vitro antifungal activity

5.3.1. Material and methods

The strains *C. albicans* (ATCC18804), *C. krusei* (ATCC200298), *C. glabrata* (ATCC90030) and *C. parapsilosis* (ATCC22019) were maintained on Sabouraud dextrose slant agar at 4 °C. The yeast were grown on Sabouraud dextrose agar for 24 h at 37 °C prior the test. Suspensions were prepared in sterile saline (8.5 g L⁻¹) and the turbidity of each yeast suspension was adjusted to 85% transmittance at 530 nm using a spectrophotometer. The resulting suspension ($1.0\text{--}5 \times 10^6\text{ CFU mL}^{-1}$) was vortexed for 15 s and the cell density was adjusted to $1.0\text{--}5 \times 10^3\text{ CFU mL}^{-1}$.

5.3.2. Susceptibility testing

All drugs were dissolved in dimethylsulphoxide (Sigma–Aldrich Quimica). Serial dilutions of the antifungal drugs were performed in RPMI-1640 medium, buffered to pH 7.0 with 0.165 mol L⁻¹ morpholinepropanesulphonic acid (MOPS; Sigma–Aldrich Quimica). All the substances were tested in the range from 0.5 to 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Flat-bottom microdilution plates containing 100 μL of the 2-fold serial dilutions of the antifungal drugs in standard RPMI-1640 medium were inoculated with 100 μL of the inoculum containing between 1.0 and $5 \times 10^3\text{ CFU mL}^{-1}$. Each sample was tested in duplicate. The microdilution plates were incubated at 37 °C and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined

visually after 24 h as the lowest drug dilution that showed a reduction in growth of 100% compared with the growth control [41,42]. The antifungal fluconazole was used as positive control.

5.4. SAR studies

Full unconstrained geometry optimizations and frequency calculations were performed at the gradient-corrected DFT level [43] using the hybrid functional formed by the three parameter fit of the exchange–correlation potential suggested by Becke [44], B3, in conjunction with the correlation functional suggested by Lee et al. [45], LYP. The 6–31G(d) basis set was used for the all the ligands' atoms. The tin atom was treated by the SBKJJC [46,47] effective core potential associated with a 2d polarized basis set [48,49]. All calculations were performed with the GAMESS program [50].

Acknowledgments

This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

Appendix. Supplementary material

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ejmech.2011.01.041.

References

- [1] J. Marui, A. Yoshimi, D. Hagiwara, Y. Fujii-Watanabe, K. Oda, H. Koike, K. Tamano, T. Ishii, M. Sano, M. Machida, K. Abe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87 (2010) 1829–1840.
- [2] M.A. Pfaller, D.J. Diekema, Clin. Microbiol. Rev. 20 (2007) 133–163.
- [3] A.S. Ribeiro, D.A. Silva, F.P. Silva, G.C. Santos, L.M.S. Soares, L.V.N. Oliveira, D.A. Santos, Braz. J. Microbiol. 41 (2010) 19–23.
- [4] R.J. Kothavade, M.M. Kura, A.G. Valand, M.H. Panthaki, J. Med. Microbiol. 59 (2010) 873–880.
- [5] D.R. Hoshenthal, C.K. Murray, M.G. Rinaldi, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48 (2004) 153–160.
- [6] A.S. Levin, S.F. Costa, N.S. Mussi, M. Bass, S.I. Sinto, C. Machado, G. Geiger, M.C. Villares, Z. Schreiber, A. Barone, M.L. Branchini, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 30 (1998) 243–249.
- [7] E.C. van Asbeck, K.V. Clemons, D.A. Stevens, Crit. Rev. Microbiol. 35 (2009) 283–309.
- [8] H. Beraldo, D. Gambino, Mini-Rev. Med. Chem. 4 (2004) 31–39.
- [9] J.E. Karp, F.J. Giles, I. Gojo, L. Morris, J. Greer, B. Jojinson, M. Thein, M. Sznol, J. Low, Leuk. Res. 32 (2008) 71–77.
- [10] D. Kovala-Demertzi, A. Alexandratos, A. Papageorgiou, P.N. Yadav, P. Dalezis, M.A. Demertzis, Polyhedron 27 (2008) 2731–2738.
- [11] L.M. Finkielstein, E.F. Castro, L.E. Fabián, G.Y. Moltrasio, R.H. Campos, L.V. Cavallaro, A.G. Moglioni, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 1767–1773.
- [12] R.C. Condit, R. Easterly, R.F. Pacha, Z. Fathi, R.J. Meis, Virology 185 (1991) 857–861.
- [13] A. Pérez-Rebolledo, 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) 939–948.
- [14] 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) 2847–2853.
- [15] R. Ramachandran, M. Rani, S. Kabilan, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 2819–2823.
- [16] C. Costello, T. Karpanen, P.A. Lambert, P. Mistry, K.J. Parker, D.L. Rathbone, J. Ren, L. Wheelton, T. Worthington, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1708–1711.
- [17] T.O. Bastos, B.M. Soares, P.S. Cisalpino, I.C. Mendes, R.G. dos Santos, H. Beraldo, Microbiol. Res. 165 (2010) 573–577.
- [18] 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.
- [19] I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870–1877.
- [20] J.G. da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301–2305.
- [21] 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.
- [22] 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.

- [23] A. Perez-Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. de Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467–472.
- [24] G. Eng, X. Song, Organotins: insecticidal/larvicidal activities and quantitative structure–activity relationships. in: A.G. Davies, M. Gielen, K.H. Pannell, E.R.T. Tiekink (Eds.), *Tin Chemistry: Fundamentals, Frontiers, and Applications*. Wiley, West Sussex, 2008, pp. 430–442.
- [25] A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247–1257.
- [26] H. Beraldo, G.M. de Lima, Anti-fungal activity of organotin compounds. in: A.G. Davies, M. Gielen, K.H. Pannell, E.R.T. Tiekink (Eds.), *Tin Chemistry: Fundamentals, Frontiers, and Applications*. Wiley, West Sussex, 2008, pp. 443–453.
- [27] 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.
- [28] D.X. West, N.M. Kozub, G.A. Bain, *Transition. Metal Chem.* 21 (1996) 52–57.
- [29] D.L. Klayman, J.F. Bartosevich, T.S. Griffin, C.J. Mason, J.P. Scovill, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 855–862.
- [30] A. Pérez-Rebolledo, G.M. da Silva, N.L. Speziali, O.E. Piro, E.E. Castellano, J.D. Ardisson, H. Beraldo, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 3919–3930.
- [31] A.M.B. Bastos, A.F.C. Ancântara, H. Beraldo, *Tetrahedron* 61 (2005) 7045–7053.
- [32] J. Otera, *J. Organomet. Chem.* 221 (1981) 57–61.
- [33] A. Pérez-Rebolledo, G.M. de Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortes, H. Beraldo, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 945–951.
- [34] J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. da Silva, M.A. Soares, R.G. dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671–5677.
- [35] CRYCALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.33.55 (release 05-01-2010 CrysAlis171.NET).
- [36] R.C. Clark, J.S. Reid, *Acta Crystallogr. A* 51 (1995) 887–897.
- [37] G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for the Solution of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany, 1997.
- [38] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M.C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Crystallogr.* 27 (1994) 435–436.
- [39] G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structure Refinement. University of Göttingen, Germany, 1997.
- [40] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838.
- [41] Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard, second ed., M27A2, National Committee for Clinical Laboratory, Wayne, PA, 2002.
- [42] V.T. Figueiredo, D.A. Santos, M.A. Resende, J.S. Hamdan, *Mycopathologia* 164 (2007) 27–33.
- [43] R.G. Parr, W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, Oxford, 1989.
- [44] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [45] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 37 (1988) 785–789.
- [46] W.J. Stevens, M. Krauss, H. Basch, P.G. Jasien, *Can. J. Chem.* 70 (1992) 612–630.
- [47] T.R. Cundari, W.J. Stevens, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5555–5565.
- [48] N.P. Labello, A.M. Ferreira, H.A. Kurtz, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1464–1471.
- [49] N.P. Labello, A.M. Ferreira, H.A. Kurtz, *Int. J. Quantum Chem.* 106 (2006) 3140–3148.
- [50] M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S.J. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery, *J. Comput. Chem.* 14 (1993) 1347–1363.



Binuclear zinc(II) complexes with the anti-inflammatory compounds salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064)

Gabrieli L. Parrilha^a, Rafael P. Vieira^a, Anayive P. Rebolledo^a, Isolda C. Mendes^b, Lidia M. Lima^c, Eliezer J. Barreiro^c, Oscar E. Piro^d, Eduardo E. Castellano^e, Heloisa Beraldo^{a,*}

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

^b Escola de Belas Artes, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c LASSBio Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio)¹, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P.O. Box 68024, 21944-971 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata and Instituto IFLP (CONICET – CCT La Plata), C.C. 67, 1900 La Plata, Argentina

^e Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2011

Accepted 19 April 2011

Available online 27 April 2011

Keywords:

Hydrazones

Semicarbazones

Crystal structures

Binuclear Zn(II) complexes

ABSTRACT

Complexes [Zn₂(HL¹)₂(CH₃COO)₂] (**1**) and [Zn₂(L²)₂] (**2**) were synthesized with salicylaldehyde semicarbazone (H₂L¹) and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064, H₂L²), respectively. The crystal structure of (**1**) was determined. Upon recrystallization of previously prepared [Zn₂(HL²)₂(Cl)₂] (**3**) in 1:9 DMSO:acetone crystals of [Zn₂(L²)₂(H₂O)₂];[Zn₂(L²)₂(DMSO)₄] (**3a**) were obtained. The crystal structure of **3a** was also determined. All crystal structures revealed the presence of phenoxo-bridged binuclear zinc(II) complexes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Semicarbazones constitute an interesting class of compounds with versatile structural features and several pharmacological applications as anticonvulsant [1–7], antiproliferative [8], antimalarial [9], antimicrobial [10], antiprotozoal [11], antinociceptive [12], and antiangiogenic agents [12]. Semicarbazones and their metal complexes also show antitumor [13], antimicrobial [10,14,15], and antioxidant [16] activities, among others.

Hydrazones present chemical as well as pharmacological applications. Aromatic hydrazones dispersed in a binder polymer possess hole-transporting properties and are used in electro-photographic photoreceptors of laser printers [17]. Hydrazones are also used as analytical reagents for the determination of trace amounts of metal ions [18]. In addition, these compounds exhibit antimicrobial, anticonvulsant, analgesic [19], anti-inflammatory [20], and antitumoral [21] properties. Hydrazones are used for controlling agricultural and horticultural insect pests [22]. Isonicoti-

noyl hydrazone derivatives were shown to possess anti-tubercular activity [23]. Acyl hydrazones have shown to possess analgesic [24,25], anti-inflammatory [25], vasodilator [26] and trypanocidal activities [27].

Metal complexes of hydrazones proved to have potential applications as catalysts [28], luminescent probes [29], and molecular sensors [30]. Moreover, it has been recently shown that hydrazones such as pyridoxal isonicotinoyl hydrazone derivatives are effective iron chelators *in vivo* and *in vitro*, and could be used in the treatment of iron overload [31]. Metal complexes with hydrazones also show antimicrobial [32], anticancer [33], and DNA-binding [34] activities.

In another work we reported an evaluation of the analgesic and anti-nociceptive activities of salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466), its regioisomer salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064), and their zinc(II)-complexes [Zn(LASSBio-466)H₂O] and [Zn(HLASSBio-1064)Cl] [35]. In the present work we report a study on binuclear zinc(II) complexes with salicylaldehyde semicarbazone (hereafter named H₂L¹) and with H₂LASSBio-1064 hereafter named H₂L² (Fig. 1). Both ligands were shown to possess analgesic and antinociceptive activities [36,37].

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095740, fax: +55 31 34095700.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

¹ <http://www.farmacia.ufrj.br/labbio>.

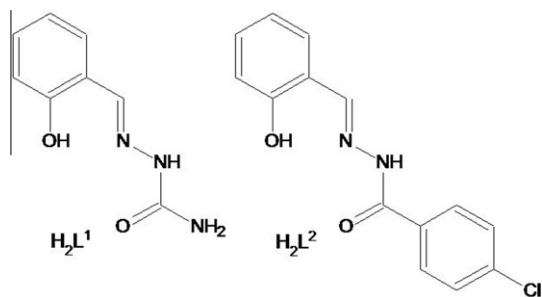


Fig. 1. Structural representation of salicylaldehyde semicarbazone (H_2L^1) and salicylaldehyde-4-chlorobenzoylhydrazone ($H_2LASSBio-1064$, H_2L^2).

2. Experimental

2.1. Physical measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. 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 ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) 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 $DMSO-d_6$ as the solvent and TMS as internal reference.

2.2. X-ray crystallography

Crystals of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**) were obtained from a methanol solution. Upon recrystallization of previously prepared $[Zn_2(HL^2)_2Cl_2]$ (**3**) [35] in 1:9 DMSO:acetone, crystals of $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (**3a**) were obtained. Single crystals of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**) and $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (**3a**) were mounted on a glass fiber and examined by structural X-ray diffraction methods.

X-ray diffraction data for **1** were collected on an Oxford-Diffraction GEMINI diffractometer (LabCri) using graphite-Enhance Source Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71069\text{ \AA}$) at 293(2) K. Data collection, integration and scaling of the reflections were performed with the CrySAlis suite programs [38].

X-ray diffraction measurements of **3a** were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer employing graphite-monochromated Mo $K\alpha$ ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) radiation. Diffraction data were gathered (φ and ω scans with κ -offsets) with COLLECT [39]. Integration and scaling of the reflections were performed with HKL DENZO-SCALEPACK [40] suite of programs. The unit cell parameters were obtained by least-squares refinement based on the angular settings for all collected reflections using HKL SCALEPACK [40]. Data were corrected empirically for absorption with PLATON [41].

Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structures were solved by direct methods using the program SHELXS-97 [42] and refined by full-matrix least-squares techniques against F^2 using SHELXL-97 [43].

Positional and anisotropic atomic displacement parameters of **1** were refined for non-hydrogen atoms. Although all hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map, in the final model only nitrogen H-atoms were refined positionally and isotropically. The other hydrogen atoms of HL^1 were included in the molecular model at stereo-chemical positions and refined with the riding method.

The hydrogen atoms of H_2L^2 in **3a** were included in the molecular model at stereo-chemical positions and refined with the riding method. The methyl H-atoms of both DMSO ligands were

Table 1
Crystal data and structure refinement.

Compound	$[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (1)	$[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (3a)
Empirical formula	$C_{10}H_{11}N_3O_4Zn$	$C_{64}H_{62}Cl_4N_8O_{14}S_4Zn_4$
Formula weight ($g\text{ mol}^{-1}$)	302.59	1700.75
T (K)	298(2)	294(2)
Crystal system	orthorhombic	triclinic
Space group	<i>Pbac</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
Crystal size (mm)	$0.15 \times 0.12 \times 0.10$	$0.12 \times 0.14 \times 0.22$
Unit cell dimensions		
a (\AA)	12.1734(10)	8.914(1)
b (\AA)	12.8476(8)	14.808(1)
c (\AA)	15.1288(7)	15.598(1)
α ($^\circ$)	90	61.933(4)
β ($^\circ$)	90	77.560(4)
γ ($^\circ$)	90	80.875(5)
V (\AA^3)	2366.1(3)	1770.2(3)
Z	8	1
D_{calc} ($Mg\text{ m}^{-3}$)	1.699	1.595
Absorption coefficient (mm^{-1})	2.086	1.676
$F(0\ 0\ 0)$	1232	868
θ Range for data collection ($^\circ$)	2.69–26.37	3.42–26.00
Limiting indices	$-9 \leq h \leq 15$ $-14 \leq k \leq 16$ $-18 \leq l \leq 15$	$-10 \leq h \leq 10$ $-18 \leq k \leq 18$ $-19 \leq l \leq 19$
Reflections collected/ unique (R_{int})	7600/2411 (0.0208)	12 607/6595 (0.083)
Completeness	$\theta = 26.37^\circ$ 100.0%	$\theta = 26.00^\circ$ 95.0%
Refinement method	full-matrix least-squares on F^2	full-matrix least-squares on F^2
Data/restraints/ parameters	2411/0/173	6595/0/448
Goodness-of-fit on F^2	0.941	1.092
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0222$ $wR_2 = 0.0547$	$R_1 = 0.0845$ $wR_2 = 0.2328$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0321$ $wR_2 = 0.0560$	$R_1 = 0.1030$ $wR_2 = 0.2536$
Largest difference in peak and hole ($e\text{ \AA}^{-3}$)	0.228 and -0.330	2.588 and -1.433

optimized by treating them as a rigid group which was allowed to rotate around the corresponding C–S bond. The water H-atoms could not be located reliably in the final residual electron density map. Their presumed positions were obtained by a procedure based on combined geometrical and force-field (Coulomb and van der Waals) calculations as reported in the literature [44] and implemented in the WINGX suit of programs [45]. A final difference Fourier map showed a residual electron density of about 2.6 e \AA^{-3} near the less bonded to the metal DMSO molecule that can be attributed to disorder of this ligand in the lattice.

In both complexes, molecular graphics were obtained from ORTEP [45–47]. Crystal data and structure refinement results for both compounds are summarized in Table 1.

2.3. Synthesis

2.3.1. Synthesis of salicylaldehyde semicarbazone (H_2L^1) and salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H_2L^2)

Salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone were prepared as previously described [35,48].

2.3.2. Synthesis of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**), $[Zn_2(L^2)_2]$ (**2**) and $[Zn_2(HL^2)_2Cl_2]$ (**3**)

Complex (**1**) was obtained by refluxing a methanol suspension of H_2L^1 with zinc acetate, in 1:4 ligand-to-metal molar ratio, while

complex (**2**) was obtained by refluxing a methanol solution of H_2L^2 with zinc acetate in 1:1 ligand-to-metal molar ratio. The resulting solids were filtered off and washed with methanol followed by diethylether and then dried *in vacuo*. Complex (**3**) was obtained as previously described [35].

2.3.2.1. $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**). White solid. *Anal. Calc.* for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{Zn}$ (302.60): C, 39.69; H, 3.66; N, 13.89. Found: C, 39.35; H, 3.79; N, 13.48%. Molar conductivity (1×10^{-4} mol L^{-1} , methanol): $52.8 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{-1} , DMSO): $35.9 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. IR (KBr or CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1674, $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1619, $\nu(\text{Zn}-\text{N})$ 465, $\nu(\text{Zn}-\text{O})$ 334. The main signals in ^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.13 (1H, H7), 7.07–6.90 (2H, N(3)–H), 7.05 (1H, H5), 6.95 (1H, H6), 6.71 (1H, H3), 6.44 (1H, H4), 1.81 (3H, s, CH_3 acetate). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 175.74 (C1), 166.65 (C8), 149.18 (C7), 133.06 (C6), 131.35 (C5), 121.52 (C3), 118.17 (C2), 113.86 (C4), 22.88 (CH_3 acetate). Yield 54%.

2.3.2.2. $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2]$ (**2**). Yellow solid. *Anal. Calc.* for $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Zn}_2$ (676.15): C, 49.74; H, 2.68; N, 8.29. Found: C, 49.50; H, 2.35; N, 8.40%. Molar conductivity (0.5×10^{-3} mol L^{-1} DMF): $13.75 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. IR (KBr or CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1601, $\nu(\text{Zn}-\text{N})$ 473, $\nu(\text{Zn}-\text{O})$ 311. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.61 (1H, H7), 8.09 (2H, H11, H13), 7.47 (2H, H10, H14), 7.28 (1H, H3), 7.15–7.25 (2H, H5, H6), 6.59 (1H, H4). Yield 91%.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the zinc(II) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Zn}(\text{HL}^1)(\text{CH}_3\text{COO})]_n$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{L}^2)]_n$ (**2**). In **1** a mono-anionic semicarbazone is attached to the metal center together with an acetate ligand. Crystal structure determination of complex (**1**) revealed that it is a dimer (see Section 3.3). In complex (**2**) the metal center is coordinated only by the di-anionic tridentate hydrazone, suggesting that **2** could as well be a dimer. In fact, coordination number three is very unlikely for zinc(II).

3.2. Spectroscopic characterization

The absorptions attributed to the $\nu(\text{O}-\text{H})$ stretching vibration at 3468 and 3436 cm^{-1} in the infrared spectra of H_2L^1 and H_2L^2 disappear in those of the complexes, in accordance with deprotonation of the phenol group [35,49].

The absorption attributed to $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1674 cm^{-1} in the spectrum of H_2L^1 shifts to 1676 cm^{-1} in the spectrum of **1** indicating coordination through the carbonyl oxygen [50–52]. The absorption assigned to $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1676 cm^{-1} in the spectrum of H_2L^2 was not found in the spectrum of **2**, in accordance with coordination of the enolate oxygen [32,52]. The absorption attributed to the $\nu(\text{C}=\text{N})$ vibration mode at 1599 and 1624 cm^{-1} in the spectra of H_2L^1

and H_2L^2 , respectively, shifts to 1601 and 1611 cm^{-1} in those of complexes (**1**) and (**2**), in agreement with coordination through the azomethine nitrogen [32,50–52].

New absorptions at 334 and 311 cm^{-1} in the spectra of **1** and **2**, respectively, were attributed to the $\nu(\text{M}-\text{O})$ vibration mode while absorptions at 465 and 473 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{M}-\text{N})$ mode [53].

The NMR spectra of the ligands and their zinc(II) complexes were recorded in DMSO- d_6 . The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signal of O(1)–H was absent in the spectra of complexes (**1**) and (**2**), in agreement with deprotonation and formation of a phenolate group. In addition, the signals of N(2)–H disappear in the spectra of both complexes, suggesting deprotonation. Hence dissolution of complex (**1**) occurs with deprotonation at N(2)–H and dissociation of the acetate ligand, probably promoted by DMSO- d_6 as described in Fig. 2. In fact, in the spectrum of **1** the signal of the hydrogens from the acetate group (δ 1.81 ppm) is characteristic of free acetate (δ 1.79 ppm).

The molar conductivity of complex (**1**) in non-coordinating methanol is characteristic of a non-electrolyte while in DMSO it reveals the presence of a 1:1 electrolyte, which is compatible with formation of acetic acid. Hence complex (**1**) is protonated at N(2) in the solid (as confirmed by its crystal structure, see Section 3.3) as well as in non-coordinating solvents such as methanol. However, coordination of DMSO- d_6 to the zinc(II) center results in release of the acetate group as acetic acid with deprotonation at N(2)–H. In previous works we demonstrated that coordination of DMSO to zinc(II) complexes with hydrazones results in release of a co-ligand [51,52].

In the ^1H NMR spectra of complexes (**1**) and (**2**) the signals of all hydrogen atoms undergo significant shifts in relation to their positions in the free ligands. In the ^{13}C NMR spectrum of **1** the signals of C(7)=N, C(8)=O and the aromatic carbons undergo significant shifts, indicating coordination through the O–N–O chelating system. The ^{13}C NMR spectrum of **2** was not obtained due to its low solubility. The significant shifts of all hydrogens upon complexation and the absence of the N(2)–H and O(1)–H signals in **2** suggest O–N–O coordination. Hence in **1** and **2** the ligands adopt the *E* configuration [35].

3.3. X-ray diffraction analysis

Fig. 3 contains perspective views of complexes (**1**) and (**3a**). Crystal data and refinement results are listed in Table 1. The crystal structures of H_2L^1 and H_2L^2 have been previously determined [48,54]. Tables 2 and 3 present selected intra-molecular bond distances and angles for H_2L^1 [48] and H_2L^2 [54] and their zinc(II) complexes (**1**) and (**3a**).

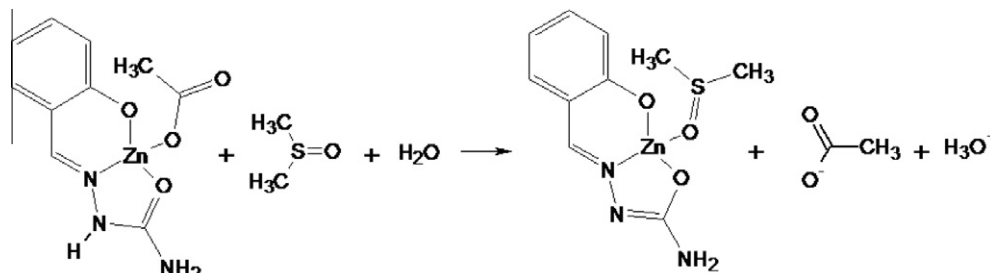


Fig. 2. Interaction of complex (**1**) with DMSO.

In $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**) the zinc(II) centers of the binuclear complex are in a five-fold trigonal bipyramidal environment. Each trigonal plane is occupied by an anionic semicarbazone coordinated through the imine nitrogen, N(1) and the carbonyl oxygen O(8), together with a phenolate O(1¹) atom of the second semicarbazone [$d(\text{Zn}-\text{N}1) = 2.074(2)$ Å, $d(\text{Zn}-\text{O}) = 2.058(1)$ and $1.990(1)$ Å, respectively]. O(2) from acetate and O(1) from phenolate occupy the apical sites [$\text{Zn}-\text{O}$ distances of $1.956(1)$ and $2.054(1)$ Å, respectively]. The metal ion departs from the trigonal plane in $0.0793(8)$ Å toward the O(8) atom. The metal–metal distance within the dimer is $3.0560(4)$ Å. Two phenoxo bridges connect the metal centers in the bimetallic complex. The ligand is nearly planar (rms deviation of atoms C7–N1–N2–C8–O8–N3 from the least-squares plane of 0.012 Å) and the metal ion departs from this plane in $0.078(2)$ Å.

Considering that complex (**1**) crystallizes as a dimer, we may suggest that it might be binuclear in the powder. Since acetate is monodentately coordinated, it is easily released upon dissolution of complex (**1**) in DMSO. Moreover, release of acetate (as acetic acid) was probably induced by the bulkiness of the DMSO ligand, and was probably favored by the basicity of acetate together with its mono-dentate character.

A twisting of approximately 180° in the N(2)–C(8) bond of the H_2L^1 to match the requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, the semicarbazone conformation varies from *EE* when free [48] to *EZ* in complex (**1**).

Upon coordination some angles undergo significant changes. The N(1)–N(2)–C(8) angle goes from $121.4(2)^\circ$ in H_2L^1 [48] to $116.1(2)^\circ$ in **1**. In addition, C(7)–N(1)–N(2) varies from $116.4(2)^\circ$ in H_2L^1 [48] to $118.1(2)^\circ$ in **1**. In complex (**1**) the O(1)–Zn–O(8)

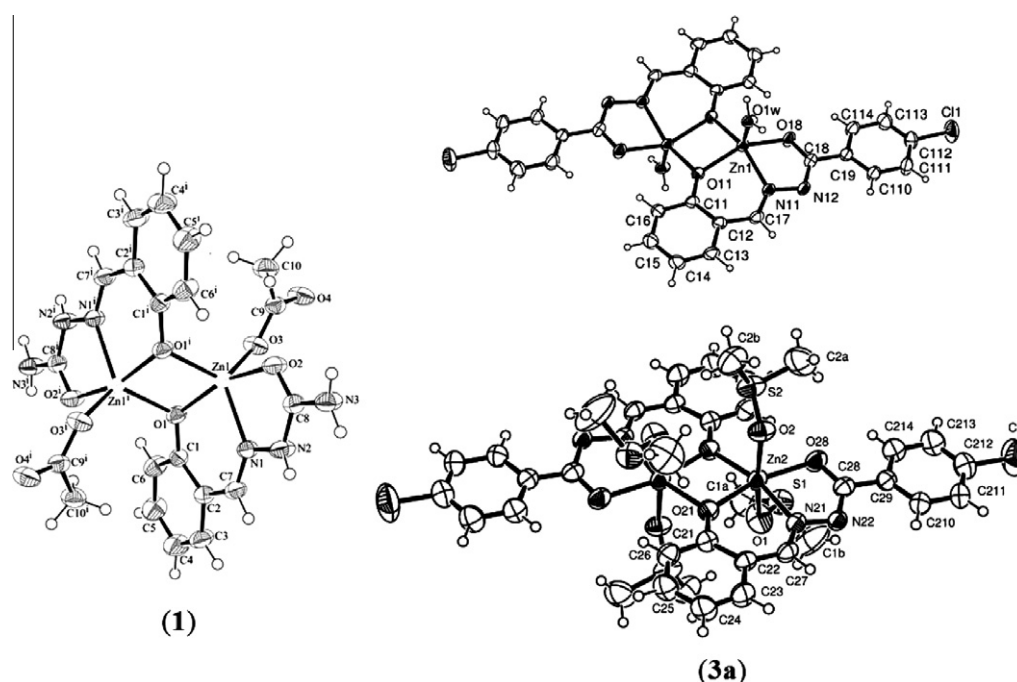


Fig. 3. Molecular plot of $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**) and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ (**3a**) binuclear complexes, showing the labeling of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 2
Selected bond distances (Å) and angles ($^\circ$) of H_1L^1 [48] and $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**).

Atom	H_1L^1 [48]	(1)	Atom	H_1L^1 [48]	(1)
C(1)–O(1)	1.353(3)	1.345(2)	N(2)–C(8)–O(2)	118.4(2)	120.55(16)
C(2)–C(7)	1.446(3)	1.443(3)	N(2)–C(8)–N(3)	118.5(2)	117.37(17)
C(7)–N(1)	1.284(3)	1.283(2)	N(3)–C(8)–O(8)	123.1(2)	122.04(18)
N(1)–N(2)	1.371(2)	1.376(2)	O(3)–Zn(1)–O(1)#1		115.29(5)
N(2)–C(8)	1.358(3)	1.348(2)	O(3)–Zn(1)–O(1)		97.11(5)
C(8)–O(8)	1.243(2)	1.249(2)	O(1)#1–Zn(1)–O(1)		81.83(5)
C(8)–O(3)	1.327(3)	1.320(2)	O(3)–Zn(1)–O(8)		96.76(5)
O(1)–Zn(1)#1		1.9895(11)	O(1)#1–Zn(1)–O(8)		102.95(5)
O(1)–Zn(1)		2.0541(12)	O(1)–Zn(1)–O(8)		161.63(5)
O(8)–Zn(1)		2.0582(12)	O(3)–Zn(1)–N(1)		119.71(6)
O(3)–Zn(1)		1.9561(12)	O(1)#1–Zn(1)–N(1)		124.53(5)
Zn(1)–O(1)#1		1.9895(11)	O(1)–Zn(1)–N(1)		84.96(5)
Zn(1)–N(1)		2.0735(15)	O(8)–Zn(1)–N(1)		77.72(5)
Zn(1)–Zn(1)#1		3.0560(4)	O(3)–Zn(1)–Zn(1)#1		111.18(4)
			O(1)#1–Zn(1)–Zn(1)#1		41.71(3)
C(2)–C(7)–N(1)	122.5(2)	124.21(17)	O(1)–Zn(1)–Zn(1)#1		40.12(3)
C(7)–N(1)–N(2)	116.4(2)	118.07(16)	O(2)–Zn(1)–Zn(1)#1		141.60(4)
N(1)–N(2)–C(8)	121.4(2)	115.99(15)	N(1)–Zn(1)–Zn(1)#1		108.06(4)

Table 3Selected bond distances (Å) and angles (°) of H_2L^2 [54] and $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (**3a**).

Atom	H_2L^2 [54]	Atom	$[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2]$	Atom	$[Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$
C(1)–O(1)	1.340(5)	C(11)–O(11)	1.343(8)	C(21)–O(21)	1.336(8)
C(2)–C(7)	1.426(6)	C(12)–C(17)	1.462(11)	C(22)–C(27)	1.438(10)
C(7)–N(1)	1.280(5)	C(17)–N(11)	1.285(9)	C(27)–N(21)	1.287(9)
N(1)–N(2)	1.391(5)	N(11)–N(12)	1.378(8)	N(21)–N(22)	1.382(8)
N(2)–C(8)	1.330(5)	N(12)–C(18)	1.328(9)	N(22)–C(28)	1.325(9)
C(8)–O(8)	1.245(5)	C(18)–O(18)	1.266(8)	C(28)–O(28)	1.278(8)
C(8)–C(9)	1.481(6)	C(18)–C(19)	1.486(10)	C(28)–C(29)	1.466(10)
		O(11)–Zn(1)#1	1.994(4)	O(21)–Zn(2)#2	2.024(5)
		O(11)–Zn(1)	2.066(5)	O(21)–Zn(2)	2.070(5)
		O(18)–Zn(1)	2.022(5)	O(28)–Zn(2)	2.098(5)
		Zn(1)–O(1W)	1.982(5)	O(1)–Zn(2)	2.258(6)
		Zn(1)–O(11) #1	1.993(5)	O(2)–Zn(2)	2.137(5)
		Zn(1)–N(11)	2.060(5)	Zn(2)–O(21)#2	2.024(5)
		Zn(1)–Zn(1) #1	3.1218(15)	Zn(2)–N(21)	2.056(5)
				Zn(2)–Zn(2)#2	3.1178(16)
C(2)–C(7)–N(1)	123.0(4)	C(12)–C(17)–N(11)	123.9(6)	C(22)–C(27)–N(21)	126.0(6)
C(7)–N(1)–N(2)	115.6(3)	C(17)–N(11)–N(12)	117.3(6)	C(27)–N(21)–N(22)	116.6(5)
N(1)–N(2)–C(8)	120.0(3)	N(11)–N(12)–C(18)	109.2(5)	N(21)–N(22)–C(28)	112.1(5)
N(2)–C(8)–O(8)	121.7(4)	N(12)–C(18)–O(18)	125.2(7)	N(22)–C(28)–O(28)	124.6(7)
N(2)–C(8)–C(9)	117.8(4)	N(12)–C(18)–C(19)	118.7(6)	N(22)–C(28)–C(29)	116.2(6)
C(9)–C(8)–O(8)	120.5(4)	C(19)–C(18)–O(18)	116.1(6)	C(29)–C(28)–O(28)	119.1(6)
		O(18)–Zn(1)–N(11)	76.5(2)	O(28)–Zn(2)–N(21)	76.9(2)
		O(11)#1–Zn(1)–O(18)	105.3(2)	O(21)#2–Zn(2)–O(28)	116.32(19)
		O(11)#1–Zn(1)–O(11)	79.5(2)	O(21)#2–Zn(2)–O(21)	80.9(2)
		O(11)–Zn(1)–O(18)	148.6(2)	O(21)–Zn(2)–O(28)	162.94(18)
		N(11)–Zn(1)–O(11)	86.9(2)	N(21)–Zn(2)–O(21)	86.2(2)
		O(11)#1–Zn(1)–N(11)	155.5(2)	O(21)#2–Zn(2)–N(21)	165.5(2)
		O(11)#1–Zn(1)–Zn(1)#1	40.59(14)	O(21)#2–Zn(2)–Zn(2)#2	40.89(13)
		O(18)–Zn(1)–Zn(1)#1	137.20(16)	O(28)–Zn(2)–Zn(2)#2	157.21(13)
		N(11)–Zn(1)–Zn(1)#1	123.05(17)	N(21)–Zn(2)–Zn(2)#2	125.75(17)
		O(11)–Zn(1)–Zn(1)#1	38.90(12)	O(21)–Zn(2)–Zn(2)#2	39.84(12)
		O(1W)–Zn(1)–O(11)#1	107.0(2)	O(21)#2–Zn(2)–O(2)	89.2(2)
		O(1W)–Zn(1)–O(18)	101.2(2)	N(21)–Zn(2)–O(2)	97.9(2)
		O(1W)–Zn(1)–N(11)	96.4(2)	O(21)–Zn(2)–O(2)	93.9(2)
		O(1W)–Zn(1)–O(11)	107.0(2)	O(28)–Zn(2)–O(2)	86.3(2)
		O(1W)–Zn(1)–Zn(1)#1	112.43(16)	O(21)#2–Zn(2)–O(1)	87.8(2)
				N(21)–Zn(2)–O(1)	87.8(2)
				O(21)–Zn(2)–O(1)	97.6(2)
				O(28)–Zn(2)–O(1)	84.1(2)
				O(2)–Zn(2)–O(1)	167.5(2)

Primed and double primed atoms are obtained from the unprimed ones through the inversion symmetry operations $-x, -y + 2, -z + 1$ (#1) and $-x + 1, -y + 1, -z$ (#2), respectively.

angle of $161.63(5)^\circ$ deviates markedly from the ideal value of 180° , probably due to the spatial requirements of the ligand chelating system. In H_2L^1 the C(8)–O(8) bond distance is $1.243(2)$ Å, while in complex (**1**) this distance is $1.249(2)$ Å due to the formation of the Zn–O bond which makes the C–O bond weaker.

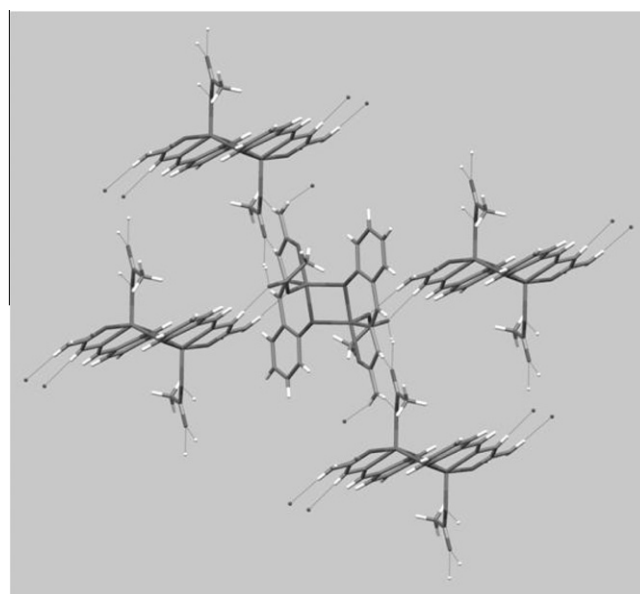
The molecular packing of complex (**1**) shows hydrogen bonding interactions of considerable strength involving N, H and O atoms (Table 4) with formation of tridimensional molecular chains as shown in Fig. 4.

As already mentioned, upon recrystallization of previously prepared $[Zn_2(HL^2)_2Cl_2]$ (**3**) [35] in 1:9 DMSO:acetone, crystals of $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(L^2)_2(DMSO)_4]$ (**3a**) were obtained (see Fig. 3). In **3a** two center symmetric binuclear zinc(II) complexes are hosted in the same lattice. In $[Zn_2(L^2)_2(H_2O)_2]$ a coordination water molecule, probably from DMSO, is attached to each zinc(II) center.

Table 4Hydrogen bonds [Å and °] in the structure of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**).

D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	\angle (DHA)
N(2)–H(2A)...O(4)#1	0.79(2)	1.94(2)	2.729(2)	177(2)
N(3)–H(3A)...O(3)#1	0.91(2)	1.98(2)	2.885(2)	172(2)
N(3)–H(3B)...O(4)#2	0.84(2)	2.03(2)	2.840(2)	162(2)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: #1: $-x, y + 1/2, -z + 3/2$; #2: $-x + 1/2, y + 1/2, z$.

**Fig. 4.** Molecular packing of $[Zn_2(HL^1)_2(CH_3COO)_2]$ (**1**).

The compound crystallizes with two different zinc(II) center symmetric binuclear complexes in the crystal asymmetric unit, namely $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$, where L^2 is the di-anionic ligand that results from deprotonation of the acylhydrazone at O(1)–H and N(2)–H. Thus once again coordination of DMSO to the zinc(II) center results in deprotonation at N(2)–H with release of the chloride co-ligand as HCl. In addition, coordination of water also resulted in deprotonation with release of HCl (see Fig. 3).

In both complexes the ligands are nearly planar (rms deviation of atoms from the least-squares plane of 0.074 Å for $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ and 0.082 Å for $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$) and close to perpendicularity [dihedral angle of 86.3(1)°]. The expected lengthening of the C(8)–O(8) bond from 1.245(5) Å in H_2L^2 [54] to 1.266(8) and 1.277(8) Å in the two dimers of **3a** was observed, indicating that C(8)–O(8) bond changes from a double to a predominantly single bond due to deprotonation at N(2) and formation of N(2)=C(8) bond. H_2L^2 [54] and all ligands in (**3a**) present EZ conformation.

In the $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ binuclear complex, the zinc(II) center is in a five-fold square pyramidal environment, coordinated at the pyramid basis to the dianionic hydrazone which binds to the metal through the phenolate and carbonyl oxygen atoms (Zn–O distances of 2.066(5) and 2.022(5) Å, respectively), and the imine nitrogen (Zn–N distances of 2.060(5) Å). The fourth coordination position is occupied by the phenolate oxygen of the dimer inverted-related L molecule [$d(\text{Zn}–\text{Oph}') = 1.993(4)$ Å]. A water molecule is at the pyramid axis [$d(\text{Zn}–\text{Ow}) = 1.982(5)$ Å]. The metal ion departs from the pyramid basis in 0.597(4) Å toward the water ligand. The metal–metal distance within the dimer is 3.122(2) Å.

In the $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ binuclear complex, the zinc(II) center is similarly coordinated to two inversion-related L ligands conforming an equatorial plane [$d(\text{Zn}–\text{Oph}) = 2.070(5)$ Å, $d(\text{Zn}–\text{Ocarb}) = 2.098(5)$ Å, $d(\text{Zn}–\text{N}) = 2.056(5)$ Å, and $d(\text{Zn}–\text{Oph}') = 2.024(5)$ Å], but now two DMSO molecules complete the axial positions of a distorted octahedral coordination around the metal (Zn–O distances of 2.137(5) and 2.258(6) Å). Here, the zinc ions lie nearly onto the equatorial coordination plane (at 0.024(4) Å). Intra-dimer Zn–Zn distance is 3.118(2) Å.

The **3a** crystal is further stabilized by a pair of $\text{Ow}–\text{H} \cdots \text{N}$ bonds of $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ with a neighboring symmetry related molecule [$d(\text{O}1\text{w} \cdots \text{N}12') = 2.66$ Å, $\angle(\text{O}1\text{w}–\text{H}1\text{w} \cdots \text{N}12') = 175^\circ$] and with a $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ complex [$d(\text{O}1\text{w} \cdots \text{N}22'') = 2.81$ Å, $\angle(\text{O}1\text{w}–\text{H}2\text{w} \cdots \text{N}22'') = 175^\circ$].

Since **3a** consists of two binuclear phenoxo-bridged zinc(II) complexes, we may suggest that complex (**3**) could also be a dimer in the powder, $[\text{Zn}_2(\text{HL}^2)_2(\text{Cl})_2]$. Moreover, since coordination number three is very unlikely for zinc(II), and considering that complexes (**2**) and (**3**) were formed with the same acylhydrazone, it is reasonable to assume that **2** is also a phenoxo-bridged binuclear zinc(II) complex. In fact, the geometry of the O–N–O chelating system of L^2 would disfavor adoption of coordination number three by the zinc(II) center.

4. Conclusion

The above mentioned results indicate that the presence of the phenol group favors the formation of phenoxo-bridged-binuclear zinc(II) complexes. The literature reports other examples of phenoxo-bridged core dimers [55–57]. In addition, as previously observed by some of us for zinc(II) complexes with hydrazones [51,52], coordination of DMSO to the zinc(II) center may lead to deprotonation at N–H with release of a co-ligand. Coordination of water also resulted in deprotonation at N(2)–H with release of a co-ligand.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR/CNPq (proc.573.364/2008-6) and FAPESP (Brazil) and to CONICET (Argentina) for financial support. O.E.P. is a Research Fellow of CONICET, Argentina.

Appendix A. Supplementary data

CCDC 808099 and 808944 contain the supplementary crystallographic data for $[\text{Zn}_2(\text{HL}^1)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ (**1**) and $[\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot [\text{Zn}_2(\text{L}^2)_2(\text{DMSO})_4]$ (**3a**). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 159.
- [2] H. Beraldo, R.D. Sinisterra, L.R. Teixeira, R.P. Vieira, M.C. Doretto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (2002) 241.
- [3] L.R. Teixeira, R.D. Sinisterra, R.P. Vieira, A. Scarlatelli-Lima, M.F.D. Moraes, M.C. Doretto, A.M. Denadai, H. Beraldo, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 54 (2006) 133.
- [4] M. Kaiser, F.J. Azeredo, F.T. Uchôa, H.O. Beraldo, T.D. Costa, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 355.
- [5] J.R. Dimmock, K.K. Sidhu, R.S. Thayer, P. Mack, M.J. Duffy, R.S. Reid, J.W. Quail, U. Pugazhenthai, A. Ong, J.A. Bikker, D.F. Weaver, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 2243.
- [6] J.R. Dimmock, K.K. Sidhu, S.D. Tumber, S.K. Basran, M. Chen, J.W. Quail, J. Yang, I. Rozas, D.F. Weaver, *Eur. J. Med. Chem.* 30 (1995) 287.
- [7] J.R. Dimmock, S.C. Vashishtha, J.P. Stables, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 241.
- [8] S. Dutta, S. Padhye, K.I. Priyadarshini, C. Newton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 2738.
- [9] R.B. de Oliveira, E.M. de Souza-Fagundes, R.P.P. Soares, A.A. Andrade, A.U. Krettli, C.L. Zani, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1983.
- [10] V.L. Siji, M.R.S. Kumar, S. Suma, M.R.P. Kurup, *Spectrochim. Acta, Part A* 76 (2010) 22.
- [11] H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, M. Risso, G. Segrera, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, A.O.M. Stoppani, M. Paulino, C. Olea-Azar, M.A. Basombrio, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 343.
- [12] L.T.S. Rocha, K.A. Costa, A.C.P. Oliveira, E.B. Nascimento, C.M. Bertollo, F. Araujo, L.R. Teixeira, S.P. Andrade, H. Beraldo, M.M. Coelho, *Life Sci.* 79 (2006) 499.
- [13] P. Nobliá, M. Vieites, B.S. Parajón-Costa, E.J. Baran, H. Cerecetto, P. Draper, M. González, O.E. Piro, E.E. Castellano, A. Azqueta, A.L. de Ceráin, A. Monge-Veja, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 443.
- [14] N.C. Kasuga, K. Sekino, C. Koumo, N. Shimada, M. Ishikawa, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 55.
- [15] N.C. Kasuga, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, S. Nakano, N. Shimada, C. Koumo, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 96 (2003) 298.
- [16] Y. Li, Z.-Y. Yang, Z.-C. Liao, Z.-C. Han, Z.-C. Liu, *Inorg. Chem. Commun.* 13 (2010) 1213.
- [17] V. Getautis, M. Daskeviciene, T. Malinauskas, V. Jankauskas, J. Sidoravicius, *Thin Solid Films* 516 (2008) 8979.
- [18] J.J. Pinto, C. Moreno, M. Garcia-Vargas, *Talanta* 64 (2004) 562.
- [19] S. Rollas, Ş.G. Küçükçel, *Molecules* 12 (2007) 1910, and references therein.
- [20] P. Vicini, M. Incerti, I.A. Doytchinova, P. La Colla, B. Busonera, R. Loddò, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 624, and references therein.
- [21] L. Savini, L. Chiasserini, V. Travagli, C. Pellerano, E. Novellino, S. Cosentino, M.B. Pisano, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 113.
- [22] N. Aggarwal, R. Kumar, C. Srivastava, P. Dureja, J.M. Khurana, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3056.
- [23] R.S. Hunoor, B.R. Patil, D.S. Badiger, R.S. Vadavi, K.B. Gudasi, V.M. Chandrashekar, I.S. Muchchandi, *Spectrochim. Acta, Part A* 77 (2010) 838.
- [24] H.J.C. Bezerra-Netto, D.I. Lacerda, A.L.P. Miranda, H.M. Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 7924, and references therein.
- [25] Y.K.C. Da Silva, C.V. Augusto, M.L.C. Barbosa, G.M.A. Melo, A.C. De queiroz, T.L.M.F. Dias, W. Bispo Jr., E.J. Barreiro, L.M. Lima, M.S. Alexandre-Moreira, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 5007.
- [26] A.E. Kümmerle, J.M. Raimundo, C.M. Leal, G.S. Da Silva, T.L. Balliano, M.A. Pereira, C.A. De Simone, R.T. Sudo, G. Zapata-Sudo, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4004.
- [27] N.C. Romeiro, G. Aguirre, P. Hernández, M. González, H. Cerecetto, I. Aldana, S. Pérez-Silanes, A. Monge, E.J. Barreiro, L.M. Lima, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 641.
- [28] O. Pournalimardan, A.-C. Chamayou, C. Janiak, H. Hosseini-Monfared, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 1599.
- [29] C. Basu, S. Chowdhury, R. Banerjee, H.S. Evans, S. Mukherjee, *Polyhedron* 26 (2007) 3617.

- [30] M. Bakir, O. Green, W.H. Mulder, *J. Mol. Struct.* 873 (2008) 17.
- [31] J.L. Buss, J. Neuzil, P. Ponka, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 755.
- [32] A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247.
- [33] V. Mahalingam, N. Chitrapriva, F.R. Fronczek, K. Natarajan, *Polyhedron* 27 (2008) 1917.
- [34] Q. Wang, Z.-Y. Yang, G.-F. Qi, D.-D. Qin, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2425.
- [35] W. Bispo Jr., M.S. Alexandre-Moreira, M.A. Alves, A. Perez-Rebolledo, G.L. Parrilha, E.E. Castellano, O.E. Piro, E.J. Barreiro, L.M. Lima, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, submitted for publication.
- [36] C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 167.
- [37] R.P. Vieira, J.A. Lessa, W.C. Ferreira, F.B. da Costa, L.F.S. Bastos, W.R. Rocha, M.M. Coelho, H. Beraldo, Unpublished results.
- [38] CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.SCALE3 ABSPACK Scaling Algorithm, CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.
- [39] Enraf-Nonius (1997–2000), COLLECT, Nonius BV, Delft, The Netherlands.
- [40] Z. Otwinowski, W. Minor, in: C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 276, Academic Press, New York, 1997, pp. 307–326.
- [41] A.L. Spek, PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 1998.
- [42] G.M. Sheldrick, SHELXS-97; Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [43] G.M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [44] M. Nardelli, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 563.
- [45] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837.
- [46] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [47] C.K. Johnson, ORTEP, Report ORNL-3794, Oak Ridge, TN, 1965.
- [48] J. Valdés-Martínez, R.A. Toscano, R. Salcedo, R. Cea-Olivares, A. Meléndez, *Monatsh. Chem.* 121 (1990) 641.
- [49] M. Salavati-Niasari, A. Amiri, *Appl. Catal. A – Gen.* 290 (2005) 46.
- [50] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *J. Mol. Struct.* 920 (2009) 97.
- [51] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 2117.
- [52] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 3797.
- [53] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fourth ed., Wiley, New York, 1986.
- [54] J.-L. Lu, S.-T. Min, X.-H. Ji, Z.-H. Dang, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* 64 (2008) O1694.
- [55] N.V. Kulkarni, G.S. Kurdekar, S. Budagumpi, V.K. Revankar, *J. Coord. Chem.* 63 (2010) 3301.
- [56] S. Ay, R.E. Ziegert, H. Zhang, M. Nieger, K. Rissanen, K. Fink, A. Kubas, R.M. Gschwind, S. Bräse, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12899.
- [57] J.-H. Wang, P.-F. Yan, G.-M. Li, J.-W. Zhang, P. Chen, M. Suda, Y. Einaga, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 3706.



Gabrieli Lessa Parrilha received her B.Sc degree in Chemistry from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro (2005). She earned her Master's Degree in Natural Sciences from the same institution (2008). She is currently a PhD student in Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais. Her experiences involve Coordination Chemistry and Medicinal Inorganic Chemistry with emphasis in the syntheses and investigation of pharmacological activities of bioactive organic molecules and their metal complexes.



Rafael Pinto Vieira received his B.Sc degree in Pharmacy from Universidade Federal de Minas Gerais (2003). He worked for five years in Brazilian Pharmaceutical companies. He earned his Master's Degree in Pharmaceutical Sciences from Universidade de São Paulo (2008). He is currently a PhD student in Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais. His experiences involve Pharmacology, Pharmaceutical Technology, Coordination Chemistry and Medicinal Inorganic Chemistry with emphasis in the syntheses and investigation of pharmacological activities of bioactive organic molecules and their metal complexes.



Anayive Perez-Rebolledo received her B.Sc degree in Chemistry from Universidad del Valle (1988). She earned her Master's Degree in Chemistry from the same institution (2000) and her PhD degree from Universidade Federal de Minas Gerais (2004). She is currently doing a pos doctoral stage at Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Brazil. Her experiences involve Coordination Chemistry and Medicinal Inorganic Chemistry with emphasis in the syntheses and investigation of pharmacological activities of bioactive organic molecules and their metal complexes. She is also involved with nuclear medicinal chemistry.



Minas Gerais, Brazil, as conservation scientist.

Isolda Maria Castro Mendes received her B.Sc. (1998) and PhD (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



new drugs candidates.

Lídia Moreira Lima Earned a B.Sc degree in Pharmacy from Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ, Brazil, 1994). M.Sc in Organic Chemistry (UFRJ, 1997) and PhD in Medicinal Chemistry (UFRJ, 2001). Post-Doctorate in Medicinal Chemistry from University of Navarra (UNAV) Spain. Associate Professor at Faculty of Pharmacy UFRJ. She is “Young Scientist of Rio de Janeiro State” (FAPERJ, BR). Has productivity grant of National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, BR). Is currently Secretary of the *Brazilian Chemical Society Rio de Janeiro*. Guides undergraduate and graduate students in Medicinal Chemistry projects aiming the discovery of



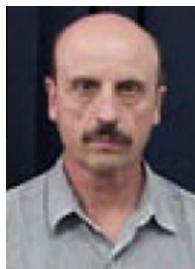
1994.

Eliezer J. Barreiro is Pharmacist and M.Sc in Chemistry of Natural Products (1973) from Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ, Brazil) and Docteur ès Sciences d'État (1978) in Medicinal Chemistry from Université Scientifique et Médicale de Grenoble (France). He is Professor of Medicinal Chemistry at UFRJ since 1986. Published over 210 articles. He is guest author of several book chapters in Medicinal Chemistry, and author of 2 books in this field. His research interests lie in the area of Medicinal Chemistry or Pharmaceutical Chemistry. Currently, is the scientific coordinator of LASSBio® (www.farmacia.ufrj.br/lassbio) which was founded in



organic, metal–organic, bioorganic and bioinorganic, and supra-molecular materials.

Oscar E. Piro received his PhD degree in Physics from the National University of La Plata (UNLP), Argentina, in 1977. He made postdoctoral research at the University of Chicago, USA, working on X-ray Crystallography of biological macromolecules (1978–1980). He is a Research Fellow of CONICET, Argentina, and Full Professor of UNLP. His research interest is grounded in Solid State Physics, particularly in Structural Crystallography by X-ray diffraction methods and also in the optical and spectroscopic (mainly infrared and Raman) properties of crystals. Currently, he works on the structure–physicochemical properties relationship of inorganic,



Eduardo Ernesto Castellano received his B.Sc (1965) and PhD (1968) degrees in Physics from Universidad Nacional de La Plata, Argentina (1965). He has a pos doc from University of Oxford (1970). He is presently Professor of Physics at Universidade de São Paulo. His interests are centered in Physics of Condensed Matter.



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.

Article

Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H₂LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H₂LASSBio-1064) and Their Zinc(II) Complexes

Walfrido Bispo Júnior ¹, Magna S. Alexandre-Moreira ¹, Marina A. Alves ², Anayive Perez-Rebolledo ³, Gabrieli L. Parrilha ³, Eduardo E. Castellano ⁴, Oscar E. Piro ⁵, Eliezer J. Barreiro ², Lídia Moreira Lima ² and Heloisa Beraldo ^{3,*}

¹ LaFI Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

² LASSBio Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio, <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/>), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P. O. Box 68024, 21944-971, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

⁴ Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

⁵ Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata and Instituto IFLP (CONICET – CCT La Plata), C.C. 67, 1900 La Plata, Argentina

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hberaldo@ufmg.br; Tel.: 55-31-3409-5740; Fax: 55-31-3409-5700.

Received: 27 June 2011; in revised form: 2 August 2011 / Accepted: 11 August 2011 /

Published: 15 August 2011

Abstract: Salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466), salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064) and their complexes [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (**1**) and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂ (**2**) were evaluated in animal models of peripheral and central nociception, and acute inflammation. All studied compounds significantly inhibited acetic acid-induced writhing response. Upon coordination the anti-nociceptive activity was favored in the complex **1**. H₂LASSBio-466 inhibited only the first phase of the formalin test, while **1** was active in the second phase, like indomethacin, indicating its ability to inhibit nociception associated with the inflammatory response. Hence coordination to zinc(II) altered the pharmacological profile of H₂LASSBio-466.

H₂LASSBio-1064 inhibited both phases but this effect was not improved by coordination. The studied compounds did not increase the latency of response in the hot plate model, indicating their lack of central anti-nociceptive activity. All compounds showed levels of inhibition of zymosan-induced peritonitis comparable or superior to indomethacin, indicating an expressive anti-inflammatory profile.

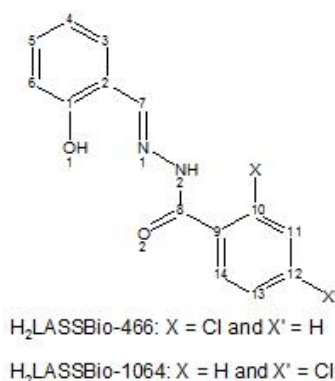
Keywords: acylhydrazones; zinc(II) complexes; analgesic activity; anti-inflammatory activity

1. Introduction

Inflammation is a response of the immune system to physical and/or chemical and/or biological injury, understanding by injury any process able to cause tissue or cellular damages. The types of inflammation (*i.e.* acute or chronic) differ by cause, mechanism, outcome, and intensity. It is well known that while acute inflammation has a physiological role in normal circumstances, chronic inflammation exerts detrimental effects on the functional status of cells and tissues. As a consequence inflammatory processes take part in a huge number of diseases such as atherosclerosis, Alzheimer disease, Parkinson disease, cancer, asthma, arthritis and so on [1-3].

Zinc is one of the most prevalent trace elements in the human body. It has been shown to be essential to the structure and function of a large number of macromolecules and for a variety of enzymatic reactions, which mediate a wide range of physiological processes [4,5]. These include production of collagen and other extracellular matrix proteins, modulation of immunoregulatory (e.g., T and B lymphocytes, macrophages, and antigen-presenting dendritic cells) and inflammatory (e.g., eosinophils, neutrophils, and mast cells) cells function. As a consequence, zinc may be considered an important immunoregulatory agent with anti-apoptotic and anti-inflammatory activities [6].

Figure 1. Generic structure of salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466) and its regioisomer salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064).



In the context of a research program that aims to contribute to the discovery of new anti-inflammatory and analgesic drug candidates, we describe the synthesis of zinc(II) complexes with salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466) and its regioisomer salicylaldehyde 4-

chlorobenzoyl hydrazone ($H_2LASSBio-1064$) (Figure 1), together with a pharmacological evaluation of all acylhydrazones and zinc(II) complexes in animal models of peripheral and central nociception and acute inflammation.

2. Results and Discussion

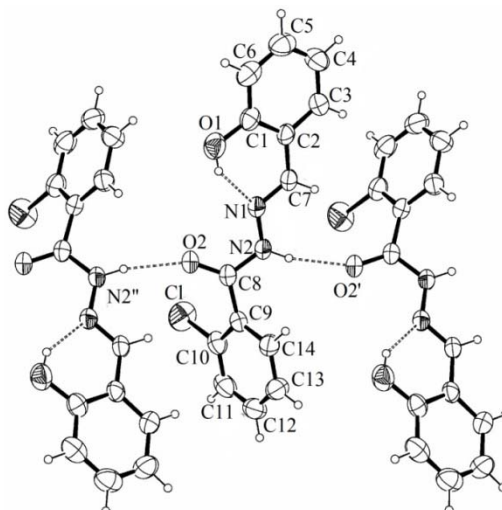
2.1. Formation of the Zinc(II) Complexes 1 and 2

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[Zn(LASSBio-466)H_2O]$ and $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]$. In the first compound a di-anionic acylhydrazone is attached to the metal center upon deprotonation at N(2)-H and O(1)-H. The remaining coordination site is occupied by a water molecule, as indicated by the infrared spectrum of the compound (Section 2.3). In the second, a mono-anionic acylhydrazone is attached to the metal upon deprotonation at O(1)-H, together with a chloride ion.

Upon recrystallization of $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]$ in 1:9 DMSO-acetone, crystals of $[Zn_2(LASSBio-1064)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(LASSBio-1064)_2(DMSO)_4]$ were obtained. The compound consists of two center symmetric binuclear zinc(II) complexes hosted in the same lattice, as previously reported by some of us [7]. We had also obtained $[Zn(LASSBio-1064)]_2$, which is a phenoxo-bridged dimer since the monomer would contain zinc(II) with coordination number three, which is very unlikely [7]. Hence $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]$ most probably also exists as a dimer, $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$.

We now obtained $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]$, in which a water molecule occupies the fourth coordination position, like in the first center symmetric unit of $[Zn_2(LASSBio-1064)_2(H_2O)_2] \cdot [Zn_2(LASSBio-1064)_2(DMSO)_4]$. Therefore, $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]$ is also probably a phenoxo-bridged dimer, $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]_2$. Considering that dimerization is favored in this class of compounds [7], the zinc(II) complexes are hereafter formulated as $[Zn(LASSBio-466)(H_2O)]_2$ (**1**) and $[Zn(HLASSBio-1064)Cl]_2$ (**2**).

Figure 2. Molecular plot of LASSBio-466 showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.



2.2. Crystal Structure of H₂LASSBio-466

Crystal data and refinement results are summarized in Table 1. Figure 2 is an ORTEP [8] drawing of the molecule and Table 2 shows the corresponding intra-molecular bond distances and angles.

Table 1. Crystal data and structure solution methods and refinement results for salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466).

Compound	H ₂ LASSBio-466	
Empirical Formula	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	
Formula Weight	274.70	
Temperature, K	294(2)	
Crystal System	Monoclinic	
Space Group	P2 ₁ /c	
Unit cell dimensions	a, Å	9.889(1)
	b, Å	13.360(2)
	c, Å	10.079(1)
	α, °	90
	β, °	93.10(1)
	γ, °	90
Volume, Å ³	1329.7(3)	
Z, Density calc., Mg/m ³	4, 1.372	
Absorption coefficient, mm ⁻¹	0.286	
F(000)	568	
Crystal size, mm	0.20 × 0.12 × 0.08	
Crystal color / shape	Colorless / prism	
θ range for data coll.	3.05 to 24.08°	
Index range	−10 ≤ h ≤ 11	
	−15 ≤ k ≤ 15	
	−11 ≤ l ≤ 11	
Completeness, θ = 26.37°	99.6 %	
Max. / min. transmission	0.977 / 0.945	
Goodness-of-fit on F ²	1.016	
Reflec. collect./unique (R _{int})	5646/2095 (0.032)	
Observed reflections [I > 2σ(I)]	1612	
Weights, w	[σ ² (F _o ²) + (0.088P) ² + 0.22P] ⁻¹ P = [Max((F _o ² , 0) + 2F _c ²)/3]	
Data / restraints / parameters	2095 / 0 / 184	
Final R indexes ^a [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0474, wR ₂ = 0.1296	
R indices (all data)	R ₁ = 0.0637, wR ₂ = 0.1479	
Extinction coefficient	0.07(1)	
Larg. peak & hole, e Å ⁻³	0.180 / -0.246	

^a R indices defined as: $R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$, $wR_2 = \frac{[\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{[\sum w(F_o^2)^2]}^{1/2}$.

The phenyl rings show a delocalized bonding structure, with C-C distances ranging from 1.370(3) to 1.388(3) Å for the chlorine-containing phenyl, where d(C_{ph}-Cl) = 1.724(3) Å, and from 1.359(4) to 1.400(3) Å for the phenol ring, where d(C_{ph}-OH) = 1.353(3) Å. We found for the carbonyl C(8)=O(2) and C(7)=N(1) groups distances of 1.226(2) and 1.272(3) Å, respectively, as expected for formal double bonds. The N(1)-N(2) length of 1.376(3) Å agrees with the single bond character of this link. The molecule conformation is stabilized by a strong intra-molecular O-H...N bond [d(O(1)⋯N(1)) =

2.632 Å, $\angle(\text{O}(1)\text{-H}(1)\cdots\text{N}(1)) = 145.7^\circ$. As shown in Figure 2 the hydrazone adopts the *E* configuration in the crystal state.

Table 2. Bond lengths [Å] and angles [°] for salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466).

Atoms	Bond lengths (Å)	Atoms	Angles (°)
Cl-C(10)	1.724(3)	O(2)-C(8)-C(9)	123.2(2)
O(1)-C(1)	1.353(3)	N(1)-C(7)-C(2)	121.1(2)
O(2)-C(8)	1.226(3)	N(2)-C(8)-C(9)	114.7(2)
N(1)-N(2)	1.376(3)	N(1)-N(2)-C(8)	118.6(2)
N(1)-C(7)	1.272(3)	N(2)-N(1)-C(7)	117.2(2)
N(2)-C(8)	1.346(3)	C(1)-C(2)-C(3)	118.3(2)
C(1)-C(2)	1.400(3)	C(1)-C(2)-C(7)	122.2(2)
C(1)-C(6)	1.384(4)	C(1)-C(6)-C(5)	120.5(3)
C(2)-C(3)	1.390(3)	C(2)-C(1)-C(6)	119.7(2)
C(2)-C(7)	1.445(3)	C(2)-C(3)-C(4)	121.1(3)
C(3)-C(4)	1.374(4)	C(3)-C(4)-C(5)	119.5(3)
C(4)-C(5)	1.371(5)	C(3)-C(2)-C(7)	119.5(2)
C(5)-C(6)	1.359(4)	C(4)-C(5)-C(6)	120.8(3)
C(8)-C(9)	1.494(3)	C(8)-C(9)-C(10)	122.4(2)
C(9)-C(10)	1.393(3)	C(8)-C(9)-C(14)	119.9(2)
C(9)-C(14)	1.388(3)	C(9)-C(10)-Cl	120.8(2)
C(10)-C(11)	1.381(4)	C(9)-C(10)-C(11)	121.1(3)
C(11)-C(12)	1.376(4)	C(9)-C(14)-C(13)	121.5(3)
C(12)-C(13)	1.371(4)	C(10)-C(9)-C(14)	117.6(2)
C(13)-C(14)	1.370(3)	C(10)-C(11)-C(12)	119.5(3)
		C(11)-C(10)-Cl	118.1(2)
		C(11)-C(12)-C(13)	120.3(3)
		C(12)-C(13)-C(14)	119.9(3)
		O(1)-C(1)-C(2)	122.4(2)
		O(1)-C(1)-C(6)	118.0(2)
		O(2)-C(8)-N(2)	122.1(2)

The solid is further stabilized by a medium-strength inter-molecular N-H \cdots O_{carbonyl} bond [$d(\text{N}(2)\cdots\text{O}(2)) = 2.885$ Å, $\angle(\text{N}(2)\text{-H}(2)\cdots\text{O}(2')) = 166.2^\circ$] between neighboring molecules, symmetry-related to each other through a glide plane, involving the imine group of a molecule as a donor and the carbonyl oxygen of the other as an acceptor. This gives rise to a polymeric structure that extends along the crystal *c*-axis (see Figure 2).

2.3. Spectroscopic Characterization

The vibrations at 3450–3436 cm⁻¹ in the infrared spectra of the free acylhydrazones attributed to $\nu(\text{O-H})$ disappear in those of the complexes, in accordance with deprotonation of the phenol group [9]. The $\nu(\text{C=O})$ absorption at 1657 cm⁻¹ in the spectrum of the H₂LASSBio-466 was not found in the spectrum of the complex **1**, indicating coordination of an enolate oxygen [10,11]. The $\nu(\text{C=O})$ absorption at 1676 cm⁻¹ in the spectrum of the H₂LASSBio-1064 shifts to 1618 cm⁻¹ in the spectrum of **2**, indicating coordination through the carbonyl oxygen [10–13]. The vibrations attributed to $\nu(\text{C=N})$ at 1625 and 1624 cm⁻¹ in the infrared spectra of the hydrazones shift to 1614 and 1611 cm⁻¹, respectively, in the spectra of the complexes, in agreement with coordination of the azomethine

nitrogen [10-13]. A new absorption at 1604 cm^{-1} in the spectrum of complex **1** was attributed to the $\nu(\text{OH}_2)$ vibration.

The NMR spectra of the acylhydrazones and their zinc(II) complexes were recorded in $\text{DMSO-}d_6$. 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 signals of all hydrogens and carbons are duplicated in the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$, indicating the presence of the *E* and *Z* configurational isomers in the $\text{DMSO-}d_6$ solution. In fact, two N(2)-H signals were observed at δ 11.05 and 9.84 ppm, which were attributed to the *Z* and *E* isomers, respectively. In the first N(2)-H is hydrogen bonded to the phenol oxygen, while in the latter it is hydrogen bonded to the solvent [10-13]. Only one signal was found for each hydrogen and each carbon in the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$. These signals are compatible with the presence of the *E* configurational isomer.

Only one signal was observed for each hydrogen and each carbon in the spectra of complexes **1-2**. The O(1)-H signals were absent in the spectra of all complexes, in agreement with deprotonation and formation of a phenolate group. In the spectrum of **1** the N(2)-H signal disappears, suggesting deprotonation of the hydrazone upon coordination. Hence in **1** a di-anionic hydrazone ligand is attached to the zinc(II) center. In the spectrum of **2** the N(2)-H signal was observed, according with the presence of a mono-anionic hydrazone ligand. In the ^1H -NMR spectra of the complexes the signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free hydrazones. Similarly, the signals of C=N, C=O and the phenol carbons undergo significant shifts in complexes **1** and **2**, indicating coordination through the $\text{O}_{\text{phenol}}\text{-N-O}$ chelating system. Hence in **1-2** the hydrazones adopt the *E* configuration.

2.4. Anti-Nociceptive Activity of $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$, $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$, $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**)

The anti-nociceptive profiles of the free ligands $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$, $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ and their zinc(II) complexes **1** and **2** were evaluated using three well-accepted pain models, namely acetic acid-induced writhing, formalin-induced nociception and hot plate test. The acetic acid-induced abdominal writhing and hot-plate test have been reported to be useful to investigate peripheral and central activity, respectively, while the formalin-induced nociception is valuable to detect both effects, including inflammatory pain.

All compounds were evaluated at a dose of $100\text{ }\mu\text{mol/kg}$ (p.o). Indomethacin, a COX-1 selective inhibitor ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) and dipyrone, a COX-3 selective inhibitor ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) were used as standard drugs in the peripheral nociception models, while morphine ($15\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) was used as standard in the hot-plate test. The analgesic activity of $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$, its regioisomer $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$, and their complexes $[\text{Zn}(\text{LASSBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{HLASSBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**) was initially evaluated employing the acetic acid-induced abdominal writhing model in mice and compared with those of the standards [14].

As shown in Table 3, all compounds produced marked inhibition of acetic acid-induced writhing response. However, the anti-nociceptive activity appears to have been favored by complex formation in the case of complex **1**, given its increased activity compared to the H₂LASSBio-466 free ligand.

Table 3. Effect of H₂LASSBio-466, its regioisomer H₂LASSBio-1064, their zinc(II) complexes, indomethacin and dipyrone (100 μmol·kg⁻¹, p.o.) on the 0.6% acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, for a period of 25 min.

Substance	n	Writhing number Mean ± S.E.M.	% of inhibition Mean ± S.E.M.
Control	6	37.5 ± 1.4	—
Indomethacin	6	6.0 ± 3.1 **	84.0 ± 8.3 **
Dipyrone	6	8.3 ± 2.7 **	77.8 ± 7.2 **
H ₂ LASSBio-466	6	14.8 ± 2.2 **	60.4 ± 6.0 **
H ₂ LASSBio-1064	6	7.0 ± 1.1 **	81.3 ± 3.0 **
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	6	6.6 ± 1.4 **	82.3 ± 3.7 **
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	6	10.8 ± 2.3 **	70.9 ± 6.2 **

Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, ** P < 0.01.

The neurogenic and inflammatory pain was evaluated using the formalin test and analyzing the first and the second phases of the nociceptive response, respectively [15]. In this model, H₂LASSBio-466 was effective in inhibiting only the first phase, while [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (**1**), like indomethacin, was active in the second phase, indicating its ability to inhibit nociception associated with inflammatory response (Table 4). H₂LASSBio-1064 was able to inhibit both neurogenic and inflammatory phases anticipating a distinct pharmacological profile. However this effect decreases on coordination to zinc(II) in complex **2**. These results suggest that coordination seems to be a good strategy to improve the antinociception profile of the prototype H₂LASSBio-466 associated with an inflammatory pain.

Table 4. Effect of prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin (100 μmol·kg⁻¹, p.o.) on formalin (2.5%) test in mice.

Substance	n	Phase 1	Phase 2	% of inhibition (Mean ± S.E.M.)	
		Mean ± S.E.M.	Mean ± S.E.M.	Phase 1	Phase 2
Control	5	54.8 ± 2.3	227.6 ± 22.7	—	—
Indomethacin	5	57.1 ± 8.5	115.9 ± 3.3 *	0	49.1 ± 1.4 *
H ₂ LASSBio-466	5	29.3 ± 8.3 **	182.4 ± 17.4	46.5 ± 8.3 **	19.8 ± 9.7
H ₂ LASSBio-1064	5	25.7 ± 4.9 *	117.0 ± 19.1 *	53.1 ± 8.9 *	48.5 ± 8.4 *
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	5	40.6 ± 12.7	142.8 ± 23.1 *	25.9 ± 15.7	37.3 ± 10.1 *
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	5	39.6 ± 7.8	161.3 ± 36.0	27.7 ± 13.1	29.2 ± 13.9

Data are expressed as mean ± S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by test t and Mann-Whitney tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, * P < 0.05 and ** P < 0.01.

In order to investigate an occasional central anti-nociceptive activity for prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064 and their zinc(II) complexes, the studied compounds were evaluated in the hot

plate test using morphine ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) as standard [16]. As shown in Table 5, these compounds did not increase the latency of response significantly, showing that they do not present activity in the supra-spinal analgesia, while morphine induced a marked increase in the latency of the animals at 60 min (9.0 ± 1.6 s), 90 min (7.4 ± 0.8 s), 120 min (5.3 ± 0.8 s) and 150 min (2.5 ± 0.2 s). These results indicate that the studied compounds do not have any central anti-nociceptive activity.

Table 5. Time course effect of prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064, their zinc(II) complexes ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) and morphine ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) on hot-plate test in mice.

Substance	n	Mean \pm S.E.M.				
		0 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Control	6	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.40	1.7 ± 0.1
Morphine	6	1.8 ± 0.5	$9.0 \pm 1.6^*$	$7.4 \pm 0.8^*$	$5.3 \pm 0.8^*$	2.5 ± 0.2
H ₂ LASSBio-466	6	2.1 ± 0.21	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.6 ± 0.1
H ₂ LASSBio-1064	6	1.7 ± 0.18	2.6 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3	3.5 ± 0.3
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	6	2.1 ± 0.2	4.2 ± 0.8	2.4 ± 0.6	3.6 ± 0.6	5.4 ± 1.2
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	6	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.9 ± 1.0	1.9 ± 0.2

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, * $P < 0.05$.

To better assess the potential anti-inflammatory activity of the free acylhydrazones and their zinc(II) complexes, the zymosan-induced peritonitis assay was performed [17]. As seen in Table 6, all compounds showed some level of inhibition in this cell migration model comparable or superior to indomethacin.

Table 6. Effect of prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) on the zymosan-induced peritonitis in mice.

Substance	n	Cell Number $\times 10^6/\text{mL}$	% of inhibition
		Mean \pm S.E.M.	Mean \pm S.E.M.
Control	7	38.0 ± 1.0	—
Saline	7	5.0 ± 0.8	—
Indomethacin	7	$17.7 \pm 1.0^{**}$	$53.4 \pm 2.7^{**}$
H ₂ LASSBio-466	7	$11.4 \pm 1.4^{**}$	$70.0 \pm 3.8^{**}$
H ₂ LASSBio-1064	7	$8.4 \pm 0.9^{**}$	$77.8 \pm 2.4^{**}$
[Zn(LASSBio-466)H ₂ O] ₂ (1)	7	$10.7 \pm 1.8^{**}$	$71.8 \pm 4.9^{**}$
[Zn(HLASSBio-1064)Cl] ₂ (2)	7	$13.4 \pm 1.5^{**}$	$64.7 \pm 4.0^{**}$

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, ** $P < 0.01$.

In fact, H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064, [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂, presented 70.0%, 77.8%, 71.8% and 64.7% of inhibition, respectively, while indomethacin inhibited cell-migration by 53.4%.

3. Experimental

3.1. General

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements (1×10^{-3} mol L⁻¹, DMF). Infrared spectra (4000–400 cm⁻¹) were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates. 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 H₂LASSBio-466 and H₂LASSBio-1064

The synthesis of H₂LASSBio-466 and H₂LASSBio-1064 were performed using a previously described methodology [18]. Briefly, salicylaldehyde (2-hydroxybenzaldehyde) was added to a solution of 2-chlorobenzohydrazide or 4-chlorobenzohydrazide (an equimolar amount) in absolute ethanol containing one drop of 37% hydrochloric acid. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours until extensive precipitation was observed. Next, the solvent was partially concentrated at reduced pressure and the resulting mixture was poured into cold water. The precipitate formed was filtered out and dried under vacuum producing the desired (*E,Z*)-salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-466) and (*E*)-salicylaldehyde 4-chlorobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064) in 87% and 91% yield, respectively. The melting point and ¹H-NMR data for both compounds were in agreement with previous reports [19,20].

3.3. Synthesis of Zinc(II) Complexes

3.3.1. Synthesis of [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (1) and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂ (2)

Complexes **1** and **2** were obtained by mixing an ethanol solution of the desired hydrazone with zinc chloride and triethylamine in 1:1:1 ligand-to-metal-to-triethylamine molar ratio. The resulting solids were washed with ethanol followed by diethylether and then dried *in vacuo*.

[Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (**1**). Yield 68%. Yellow solid. Anal. Calc. for C₂₈H₂₂N₄O₆Cl₂Zn₂ (712.18): C, 47.26%; H, 2.85%; N, 7.40%. Found: C, 47.22%; H, 3.11%; N, 7.87%. M.P. > 300 °C. Molar conductivity: 8.23 Ω⁻¹cm² mol⁻¹. IR: ν(C=N) 1614, ν(Zn-OH₂) 1604, ν(phenolic, CO) 1329. ¹H-NMR: δ (ppm) = 7.54 (1H, H7), 7.47–7.59 (1H, H14), 7.52 (1H, H11), 7.51 (1H, H5), 7.44–7.47 (1H, H3), 7.32 (1H, H13), 7.28 (1H, H13), 6.79 (1H, H6), 6.70 (1H, H4). ¹³C-NMR: δ (ppm) = 169.73 (C8), 158.02 (C1), 150.59 (C7), 135.87 (C10), 135.09 (C12), 134.37 (C13), 131.38 (C5), 130.35 (C11), 129.81 (C14), 127.48 (C3), 119.69 (C9, C2), 119.35 (C4), 118.37 (C6).

[Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂ (**2**). Yield 71%. Yellow solid. Anal. Calc. for C₂₈H₂₀N₄O₄Cl₄Zn₂ (749.11): C, 44.72%; H, 2.24%; N, 7.10%. Found: C, 44.89%; H, 2.69%; N, 7.48%. M.P. > 300 °C. Molar conductivity: 11.35 Ω⁻¹cm² mol⁻¹. IR: ν(N-H) 3179, ν(C=O) 1618, ν(C=N) 1611, ν(phenolic, CO) 1281. ¹H-NMR: δ (ppm) = 8.99 (1H, H7), 8.01 (2H, H11, H13), 7.59 (2H, H10, H14), 7.38 (1H, H3),

7.24 (1H, H5), 6.73 (1H, H6), 6.89 (1H, H4). ^{13}C -NMR: δ (ppm) = 168.88 (C8), 166.81 (C1), 155.61 (C7), 136.83 (C12), 131.62 (C5), 129.68 (C10,C14), 129.58 (C3), 128.79 (C11, C13), 119.53 (C4), 118.75 (C9, C2), 116.54 (C6).

3.4. X-ray Crystallography

The X-ray diffraction measurements were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer with graphite-monochromated $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) radiation. Diffraction data were collected (φ and ω scans with κ -offsets) with COLLECT [21]. Integration and scaling of the reflections were performed with HKL DENZO-SCALEPACK [22] suite of programs. The unit cell parameters were obtained by least-squares refinement based on the angular settings for all collected reflections using HKL SCALEPACK. The structure was solved by direct methods with SHELXS-97 [23] and the molecular model refined by full-matrix least-squares procedure on F^2 with SHELXL-97 [24]. The hydrogen atoms were included in the molecular model at stereo-chemical positions and refined with the riding model.

3.5. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$, $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$, $[\text{Zn}(\text{LassBio-466})\text{H}_2\text{O}]_2$ (**1**) and $[\text{Zn}(\text{HLassBio-1064})\text{Cl}]_2$ (**2**)

3.5.1. Animals

Experiments were conducted using Swiss mice obtained from the BIOCEN - UFAL breeding unit, weighing 20–30 g each, males or females, adult, with 6 to 8 weeks of age, distributed in groups of up to 6–8 animals for treatment. The animals were maintained with free access to food and water and kept at 25–28 °C under a controlled 12 h light-dark⁻¹ cycle. All animals were manipulated according to the norms established by the Ethics Commission - UFAL for handling animals (protocol number: 026681/2009-23).

3.5.2. Writhing Test

This test was performed as described by Collier and coworkers [14]. Acetic acid (0.6%, v/v) was administered i.p. in a volume of $0.1 \text{ mL} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$. The number of writhes, a response consisting of contraction of an abdominal wall, pelvic rotation followed by hind limb extension, was counted during continuous observation for 20 min. beginning 5 min. after the acetic acid injection. The prototypes $\text{H}_2\text{LASSBio-466}$, $\text{H}_2\text{LASSBio-1064}$ and their zinc(II) complexes, indomethacin and dipyron were administered at the dose of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ (p.o), 40 min. before the acetic acid injection. Control group received $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ of vehicle (arabic gum, p.o.). Anti-nociceptive activity was expressed as inhibition percentage of the usual number of writhing observed in control animals.

3.5.3. Formalin-Induced Pain in Mice

The formalin test was performed as described by Hunskaar and Hole [15]. Animals received 20 μL of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde in saline) in the ventral surface of the right hind paw. They were observed from 0 to 5 min. (neurogenic phase) and from 15 to 30 min. (inflammatory phase) after injection and the time they spent licking the injected paw was recorded and considered as

indicative of nociception. The prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin were administered at the dose of 100 µmol·kg⁻¹ (p.o), 40 min. before formalin injection. Control group received 10 mL·kg⁻¹ of vehicle (arabic gum, p.o.).

3.5.4. Hot-Plate Test

Mice were treated according to the method described by Eddy and Leimbach [16]. Each mouse was placed on the hot plate set at 54 ± 1.0 °C and the time of paw licking was recorded before and 30 min. after oral administration of the tested compounds. The prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064 and their zinc(II) complexes were administered at the dose of 100 µmol·kg⁻¹ (p.o). Control group received 10 mL·kg⁻¹ of vehicle (arabic gum, p.o.). Morphine was also used as a drug standard at the dose of 15 µmol·kg⁻¹ (i.p.). Analgesia was defined as an increase in the latency of paw licking, and the latency times were compared with the values obtained for control. Sixty seconds were taken as the cut-off time to avoid mouse tissue damage.

3.5.5. Zymosan-Induced Peritonitis

Peritoneal inflammation was induced according to the method described by Doherty [17]. A solution of zymosan A (Sigma-Aldrich, 2 mg·mL⁻¹) was prepared in saline (0.9% NaCl) and injected into the peritoneal cavity of mice (0.5 mL). Six hours after injection of zymosan A, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the peritoneal cavity was washed with cold Hank's solution (3 mL). The prototypes H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064, their zinc(II) complexes and indomethacin were administered at the dose of 100 µmol·kg⁻¹ (p.o), 40 min. before zymosan A injection. The control group received 10 mL·kg⁻¹ of vehicle (arabic gum, p.o.). The number of cells was quantified using an optical microscope, and a 100 x lens.

3.5.6. Statistical Analysis

Data obtained from animal experiments are represented by mean ± standard error of the mean (Mean ± S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by test t of Student or ANOVA in the tutorial Prisma®. Values were considered significant if * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001.

4. Conclusions

The studied compounds, evaluated at a dose of 100 µmol/kg (p.o), showed marked inhibition of acetic acid-induced writhing response, with the anti-nociceptive activity being favored by zinc(II) complex formation in the case of complex **1**. The compounds also have antinociception profile associated with inflammatory pain, with no activity in murine analgesic model of central pain. In the formalin model, H₂LASSBio-466 was effective in inhibiting only the first phase, while its zinc(II) complex **1**, like indomethacin, was active in the second phase, indicating its ability to inhibit nociception associated with inflammatory response. Hence coordination to zinc(II) altered the pharmacological profile of H₂LASSBio-466. Moreover, the salicyladehyde *N*-acylhydrazone

derivatives and their zinc(II) complexes showed comparable or superior inhibition of cell-migration process to indomethacin, indicating an expressive anti-inflammatory profile.

The different activities of the complexes could be explained by their releasing hydrazone at different rates during the assays. In addition, complex **1** contains a di-anionic hydrazone while **2** contains a mono-anionic hydrazone. Hence different electronic effects could also influence the distinct pharmacological profiles of complexes **1** and **2**. In addition, **1** contains a water molecule in the metal coordination sphere while **2** contains a chloride ion. Finally, coordination could in principle alter the bioavailability of the two hydrazones in different manners. The above-mentioned results suggest that further studies on the anti-inflammatory properties of this class of compounds and their zinc(II) complexes should be carried out in order to investigate their mechanism of action

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR (CNPq proc.573.364/2008-6), FAPESP (Brazil) and to CONICET (Argentina) for financial support. O. E. P. is a Research Fellow of CONICET, Argentina.

Supplementary Material

CCDC 805145 contains the supplementary crystallographic data for salicylaldehyde 2-chlorobenzoyl hydrazone (H₂Lassbio-466). This data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

1. Yong, V.W. Inflammation in neurological disorders: A help or a hindrance? *Neuroscientist* **2010**, *16*, 408-420.
2. Kominsky, D.J.; Campbell, E.L.; Colgan, S.P. Metabolic shifts in immunity and inflammation. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 4062-4068.
3. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883-899.
4. Tapiero, H.; Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 399-411.
5. Szewczyk, B.; Kubera, M.; Nowak, G. The role of zinc in neurodegenerative inflammatory pathways in depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2011**, *35*, 693-701.
6. Zaleski, P.D.; Truong-Tran, A.Q.; Grosser, D.; Jayaram, L.; Murgia, C.; Ruffin, R.E. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanism and clinical targets. A review. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *105*, 127-149.
7. Parrilha, G.L.; Vieira, R.P.; Rebolledo, A.P.; Mendes, I.C.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Binuclear zinc(II) complexes with the anti-inflammatory

- compounds salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone. *Polyhedron* **2011**, *30*, 1891-1898 and references therein.
8. Johnson, C.K. *ORTEP; Report ORNL-3794*; Oak Ridge National Laboratory: Tennessee, 1965.
 9. Salavati-Niasari, M.; Amiri, A. Synthesis and characterization of alumina-supported Mn(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes of bis(salicylaldiminato)hydrazone as catalysts for oxidation of cyclohexene with tert-butylhydroperoxide. *Appl. Catal. A Gen.* **2005**, *290*, 46-53.
 10. Despaigne, A.A.R.; Da Silva, J.G.; Do Carmo, A.C.M.; Sives, F.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-formylpyridine-derived hydrazones. *Polyhedron* **2009**, *28*, 3797-3803.
 11. Despaigne, A.A.R.; Vieira, L.F.; Mendes, I.C.; Da Costa, F.B.; Speziali, N.L.; Beraldo, H. Organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: Antimicrobial activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1247-1257.
 12. Despaigne, A.A.R.; Da Silva, J.G.; Do Carmo, A.C.M.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Structural studies on zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-derived hydrazones. *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 2117-2122.
 13. Despaigne, A.A.R.; Da Silva, J.G.; Do Carmo, A.C.M.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Beraldo, H. Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-methyl hydrazone. *J. Mol. Struct.* **2009**, *920*, 97-102.
 14. Coolier, H.O.J.; Dinneen, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. Abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* **1968**, *32*, 295-310.
 15. Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103-114.
 16. Eddy, N.B.; Leimbach, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenylamines and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *107*, 385-393.
 17. Doherty, N.S.; Poubelle, P.; Borgeat, P.; Beaver, T.H.; Westrich, G.L.; Schrader, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E₂. *Prostaglandins* **1985**, *30*, 769-789.
 18. Da Silva, Y.K.C.; Augusto, C.V.; Barbosa, M.L.C.; Melo, G.M.A.; De Queiroz, A.C.; Dias, T.L.M.F.; Bispo, W., Jr.; Barreiro, E.J.; Lima, L.M.; Alexandre-Moreira, M.S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine *N*-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5007-5015.
 19. Dutta, M.M.; Goswami, B.N.; Katakya, J.C.S. Studies on biologically-active heterocycles. III. Synthesis and antibacterial activity of some 2-aryl/arakyl-3-substituted-4-thiazolidinones. *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 332-334.
 20. Ainscough, E.W.; Brodie, A.M.; Denny, W.A.; Finlay, G.J.; Gothe, S.A.; Ranford, J.D. Cytotoxicity of salicylaldehyde benzoylhydrazone analogs and their transition metal complexes: quantitative structure-activity relationships. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 125-133.
 21. Enraf-Nonius. *COLLECT*; Nonius BV: Delft, The Netherlands, 1997-2000.
 22. Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods in Enzymology*; Carter, C.W., Jr., Sweet, R.M., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1997; pp. 307-326.
 23. Sheldrick, G.M. *SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution*; University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997.

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

Sample Availability: Samples of the compounds H₂LASSBio-466, H₂LASSBio-1064 and complexes [Zn(LASSBio-466)H₂O]₂ (**1**) and [Zn(HLASSBio-1064)Cl]₂ (**2**) are available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes exhibit high anti-trypanosomal activity

Gabrieli L. Parrilha^a, Roberta P. Dias^a, Willian R. Rocha^a, Isolda C. Mendes^b, Diego Benítez^c, Javier Varela^c, Hugo Cerecetto^c, Mercedes González^c, Cristiane M.L. Melo^d, Juliana K.A.L. Neves^d, Valéria R.A. Pereira^d, Heloisa Beraldo^{a,*}

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

^b Escola de Belas Artes, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Grupo de Química Medicinal, Laboratório de Química Orgânica Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay

^d Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2011

Accepted 12 October 2011

Available online 18 October 2011

Keywords:

Thiosemicarbazones
Antimony(III) complexes
Anti-trypanosomal activity
SAR studies

ABSTRACT

Complexes [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**), [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**), [Sb(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (**3**), [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] (**4**), [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂] (**5**) and [Sb(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (**6**) were obtained with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-chlorophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh) and its *N*(4)-*ortho*-fluor (H2Ac4oFPh) and *N*(4)-*ortho*-nitro (H2Ac4oNO₂Ph) analogues, and with the corresponding 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones (H2Bz4oClPh, H2Bz4oFPh, H2Bz4oNO₂Ph). The studied compounds are excellent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. H2Bz4oClPh and complexes (**4**) and (**1**) were the most trypanosomicidal.

Upon coordination of H2Ac4oClPh to antimony(III) in **1**, the therapeutic index (TI) goes from 10.58 to 14.35. However, the best values of TI were found for H2Bz4oClPh (TI = 1240) and H2Ac4oNO₂Ph (TI = 773). Structure–activity relationship (SAR) studies did not allow the establishment of correlations between the anti-trypanosomal activity and physico-chemical parameters, but correlations were found between the cytotoxicities and physico-chemical properties.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) indicates infectious and parasitic diseases as major causes of human disease worldwide. Unlike other communicable diseases that receive a high level of attention from health systems, a group of parasitic and infectious diseases has been characterized by historically low investment by the pharmaceutical industry. To date, more than one billion – roughly one sixth of the world's population – are affected by neglected tropical diseases [1].

Chagas' disease (CD) is the third largest disease burden in Latin America after malaria and schistosomiasis, all considered as neglected diseases. The etiologic agent of CD is the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* [2–4]. This parasitic disease represents a real health public problem in South America, affecting at least 15 million people with more than 25 million at the risk of infection [4].

Current treatment of this disease is based on nifurtimox (NFx, a nitrofurant derivative) and benznidazole (a nitroimidazole derivative), introduced more than three decades ago [5]. Both drugs have important disadvantages such as severe side effects, strain

resistance, and variable efficacy [6–9]. Hence the development of more safe and efficient drugs against CD is urgent.

Thiosemicarbazones are an interesting class of compounds which present a wide range of bioactivities as antitumoral [10], antiviral [11], antimicrobial [12] and anti-protozoal [13] agents. Thiosemicarbazones proved to be active against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* [14]. Thiosemicarbazones also show antimalarial [15] and anti-trypanosomal [13] activity. In many cases upon coordination to metal ions the anti-protozoal [16,17] and antimicrobial [18] activities increase, suggesting that complexation can be an interesting strategy of dose reduction.

The major clinical use of antimony compounds is as a treatment for *Leishmaniasis* [19,20]. Considering the biochemical similarities between *Leishmania* and *Trypanosoma* [21] and that antimony is active against *Leishmania*, in the present work an investigation on the anti-trypanosomal activity of antimony(III) complexes with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-chlorophenyl thiosemicarbazone (H2Ac4oClPh) and its *N*(4)-*ortho*-fluorophenyl (H2Ac4oFPh) and *N*(4)-*ortho*-nitrophenyl (H2Ac4oNO₂Ph) analogues, together with the corresponding 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones (H2Bz4oClPh, H2Bz4oFPh and H2Bz4oNO₂Ph) was carried out (see Fig. 1).

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5771; fax: +55 31 3409 5700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

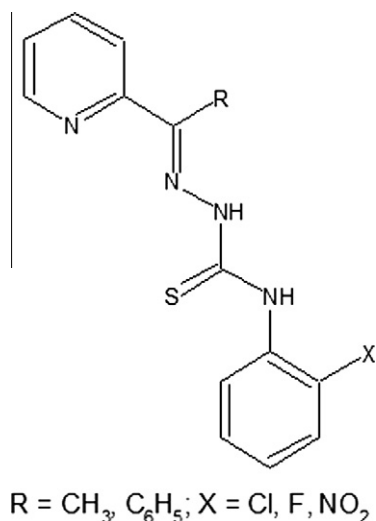


Fig. 1. Generic representation for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones.

2. Experimental

2.1. Physical measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. 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. Synthesis of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones

2-Acetylpyridine-*N*(4)-*o*-chlorophenyl thiosemicarbazone, its *N*(4)-*o*-fluorophenyl and *N*(4)-*o*-nitrophenyl analogues and the corresponding 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones were prepared as previously described [15,22,23].

2.3. Synthesis of antimony(III) complexes [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (1), [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (2), [Sb(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (3), [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] (4), [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂] (5) and [Sb(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (6)

The antimony(III) complexes were obtained by stirring under reflux a methanol solution of the desired ligand (1.0 mmol) with an equimolar amount of SbCl₃ for 6 h. The solids were washed with methanol, diethylether and then dried *in vacuo*. Crystals of complexes (1) and (2) suitable for X-ray diffraction were obtained by slow recrystallization from a DMSO-*d*₆ solution.

2.3.1. Dichloro[*N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]antimony(III) [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (1)

Yellow solid. *Anal. Calc.* for C₁₄H₁₂N₄Cl₃SSb (496.46): C, 33.87; H, 2.44; N, 11.29. Found: C, 33.85; H, 2.39; N, 11.19%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 13.02 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 241.9–245.0 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1597, ν(CS) 753, ρ(py) 642. (CsI/nujol, cm⁻¹): ν(Sb–N) 448, ν(Sb–S) 360, ν(Sb–Cl) 321, ν(M–Npy) 229. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.04 (1H, N(4)H), 9.11 (1H, H6), 8.42–8.29 (1H, H4), 8.42–8.29 (1H, H3), 7.89 (1H, H5),

2.65 (3H, H15). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.51 (C8), 151.37 (C2), 144.86 (C7), 144.42 (C6), 142.20 (C4), 127.46 (C5), 125.32 (C3), 16.19 (C15). Yield: 94%.

2.3.2. Dichloro[*N*(4)-*ortho*-fluorophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]antimony(III) [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (2)

Yellow solid. *Anal. Calc.* for C₁₄H₁₂N₄Cl₂FSSb (480.00): C, 35.03; H, 2.52; N, 11.67. Found: C, 35.27; H, 2.85; N, 11.73%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 13.01 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 243–245.8 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1612, ν(CS) 753, ρ(py) 643. (CsI/nujol, cm⁻¹): ν(Sb–N) 457, ν(Sb–S) 427, ν(Sb–Cl) 324, ν(M–Npy) 241. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.11 (1H, N(4)H), 9.11 (1H, H6), 8.37–8.31 (1H, H4), 8.37–8.31 (1H, H3), 7.89 (1H, H5), 2.68 (3H, H15). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 169.92(C8), 151.70 (C2), 144.86 (C7), 144.46 (C6), 142.21 (C4), 127.40 (C5), 125.41 (C3), 16.32 (C15). Yield: 93%.

2.3.3. Dichloro[*N*(4)-*ortho*-nitrophenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato]antimony(III) [Sb(2Ac4oNO₂Ph)Cl₂] (3)

Yellow solid. *Anal. Calc.* for C₁₄H₁₂N₅O₂Cl₂SSb (507.01): C, 33.17; H, 2.39; N, 13.81. Found: C, 33.20; H, 2.31; N, 13.74%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 11.25 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 242.7–242.9 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1604, ν(CS) 741, ρ(py) 639. (CsI/nujol, cm⁻¹): ν(Sb–N) 447, ν(Sb–S) 340, ν(Sb–Cl) 323, ν(M–Npy) 236. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.50 (1H, N(4)H), 9.14 (1H, H6), 8.40–8.36 (1H, H4), 8.40–8.36 (1H, H3), 7.91 (1H, H5), 2.62 (3H, H15). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 168.97 (C8), 153.22 (C2), 144.74 (C7), 144.58 (C6), 142.27 (C4), 127.69 (C5), 125.65 (C3), 16.30 (C15). Yield: 98%.

2.3.4. Dichloro[*N*(4)-*ortho*-chlorophenyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazonato]antimony(III) [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] (4)

Orange solid. *Anal. Calc.* for C₁₉H₁₄N₄Cl₃SSb (558.53): C, 40.86; H, 2.53; N, 10.03. Found: C, 40.95; H, 2.53; N, 9.98%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 11.45 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 214.8–217.5 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1586, ν(CS) 752, ρ(py) 644. (CsI/nujol, cm⁻¹): ν(Sb–N) 472, ν(Sb–S) 334, ν(Sb–Cl) 308, ν(M–Npy) 224. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.84 (1H, s, N(4)H), 9.20 (1H, d, H6), 8.23 (1H, t, H4), 7.88 (1H, dt, H5), 7.43 (1H, d, H3). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.46 (C8), 150.62 (C2), 145.07 (C7), 145.15 (C6), 141.99 (C4), 126.82 (C5), 126.68(C3). Yield: 62%.

2.3.5. Dichloro[*N*(4)-*ortho*-fluorophenyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazonato]antimony(III) [Sb(2Bz4oFPh)Cl₂] (5)

Orange solid. *Anal. Calc.* for C₁₉H₁₄N₄Cl₂FSSb (542.07): C, 42.10; H, 2.60; N, 10.34. Found: C, 41.03; H, 2.58; N, 10.45%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 9.68 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 227.5–229.9 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1615, ν(CS) 760, ρ(py) 641. (CsI/nujol, cm⁻¹): ν(Sb–N) 474, ν(Sb–S) 337, ν(Sb–Cl) 318, ν(M–Npy) 220. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 10.01 (1H, N(4)H), 9.21 (1H, H6), 8.25 (1H, H4), 7.89 (1H, H5), 7.47 (1H, H3). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 169.71 (C8), 151.08 (C2), 145.03 (C7), 145.20 (C6), 141.96 (C4), 126.86 (C5) 125.89(C3). Yield: 72%.

2.3.6. Dichloro[*N*(4)-*ortho*-nitrophenyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazonato]antimony(III) [Sb(2Bz4oNO₂Ph)Cl₂] (6)

Orange solid. *Anal. Calc.* for C₁₉H₁₄N₅O₂Cl₂SSb (569.08): C, 40.10; H, 2.48; N, 12.31. Found: C, 40.08; H, 2.41; N, 12.25%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹, DMF): 11.44 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 210.4–212.5 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1605, ν(CS) 741,

$\rho(\text{py})$ 640. (Csl/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{Sb-N})$ 470, $\nu(\text{Sb-S})$ 341, $\nu(\text{Sb-Cl})$ 307, $\nu(\text{M-Npy})$ 220. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 10.29 (1H, s, N(4)H), 9.27 (1H, d, H6), 8.26 (1H, H4), 7.96–7.92 (1H, H3), 7.91 (1H, H5). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 168.97 (C8), 153.30 (C2), 145.60 (C6), 145.00 (C7), 142.09 (C4), 127.72 (C5), 125.22 (C3). Yield: 67%.

2.4. X-ray crystallography

Crystals of $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**) and $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**) were mounted on glass fibers and used for data collection. X-ray diffraction data collection was performed on an Oxford-Diffraction GEMINI diffractometer (LabCri) using graphite-Enhance Source Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71069 \text{ \AA}$) at 293(2) K. Data integration and scaling of the reflections were performed with the CrysAlis suite [24]. Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structures were solved by direct methods using the program SHELXS-97 [25] and refined by full-matrix least-squares techniques against F^2 using SHELXL-97 [26]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for non hydrogen atoms. Although some hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map, in the final model they were geometrically positioned and refined using a riding model. Molecular graphics were obtained from ORTEP [27,28].

2.5. Anti-trypanosomal activity

T. cruzi epimastigotes (Tulahuen 2 strain) were grown at 28 °C in an axenic medium (BHI-Tryptose) as previously described [29,30], complemented with 5% fetal calf serum. Cells were harvested in the late log phase, re-suspended in fresh medium, counted in Neubauer's chamber and placed in 24-well plates ($2 \times 10^6/\text{mL}$). Cell growth was measured as the absorbance of the culture at 590 nm, which was proved to be proportional to the number of cells present. Before inoculation, the media were supplemented with the indicated amount of the studied compound from a stock solution in DMSO. The final concentration of DMSO in the culture media never exceeded 0.4% and the control was run in the presence of 0.4% DMSO and in the absence of any compound. No effect on epimastigotes growth was observed by the presence of up to 1% DMSO in the culture media. Nfx was used as the reference trypanosomicidal drug and antimony(III) chloride was included in these assays to provide the trypanosomicidal effect of antimony(III) *per se*. The percentage of growth inhibition (PGI), was calculated as follows: $\text{PGI} = \{1 - [(A_p - A_0p)/(A_c - A_0c)]\} \times 100$, where $A_p = A_{600}$ of the culture containing the studied compound at day 5; $A_0p = A_{600}$ of the culture containing the studied compound right after addition of the inocula (day 0); $A_c = A_{600}$ of the culture in the absence of any compound (control) at day 5; $A_0c = A_{600}$ in the absence of the compound at day 0. To determine $\text{ID}_{50,T.cruzi}$ values, parasite growth was followed in the absence (control) and presence of increasing concentrations of the corresponding compound. The $\text{ID}_{50,T.cruzi}$ values were determined as the drug concentrations required to reduce by half the absorbance of the control (without compound).

2.6. Cytotoxic activity

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 nine concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 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 ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) 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 compounds-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.

2.7. SAR studies

Full unconstrained geometry optimizations and frequency calculations were performed at the gradient-corrected DFT level [31] using the hybrid functional formed by the three parameter fit of the exchange–correlation potential suggested by Becke [32], B3, in conjunction with the correlation functional suggested by Lee et al. [33]. The 6-31G(d) basis set was used for all atoms of the ligands. The inner electrons of the antimony atom were treated by the SBKJC effective core potential [34,35] and the valence electrons with a 2d polarized basis set [36,37]. All calculations were performed with the GAMESS-US program [38].

3. Results and discussion

3.1. Formation of the antimony(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**), $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**), $[\text{Sb}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), $[\text{Sb}(\text{2Bz4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**4**), $[\text{Sb}(\text{2Bz4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**5**) and $[\text{Sb}(\text{2Bz4oNO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**6**) in which an anionic thiosemicarbazone is attached to the metal centre together with two chloride ions.

3.2. Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to $\nu(\text{C=N})$ at 1618–1582 cm^{-1} in the infrared spectra of the thiosemicarbazones shift to 1615–1586 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1–6**), in agreement with coordination of the azomethine nitrogen [16,18,39,40]. The $\nu(\text{CS})$ absorption observed in the 801–782 cm^{-1} range in the spectra of the free thiosemicarbazones shifts to 760–741 cm^{-1} in the spectra of **1–6**, indicating coordination of the sulfur. The 56–30 cm^{-1} shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [16,39]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 630–614 cm^{-1} in the spectra of the uncomplexed thiosemicarbazones shifts to 644–639 cm^{-1} in complexes (**1–6**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [16,18,39,40].

In the spectra of **1–6** the absorptions at 474–447 cm^{-1} and 427–334 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{Sb-N})$ and $\nu(\text{Sb-S})$ vibrations and those at 241–220 cm^{-1} to $\nu(\text{Sb-N}_{\text{py}})$ vibrations [41–43]. Therefore in the complexes the thiosemicarbazones are attached to the metal through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ chelating system. One absorption attributed to $\nu(\text{Sb-Cl})$ at 324–307 cm^{-1} was observed in the spectra of all complexes [42–44].

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, 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 are duplicated in the ^1H NMR spectra of the thiosemicarbazones, indicating the presence of the *E* and *Z* configurational isomers in the $\text{DMSO}-d_6$ solution. In the first, $\text{N}(3)\text{-H}$ is hydrogen bonded to the solvent while in the second $\text{N}(3)\text{-H}$ is hydrogen bonded to the heteroaromatic nitrogen [45–48]. In the spectra of the 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones the signals of $\text{N}3\text{-H}$ at δ 14.84–14.68 and at δ 11.18–10.90 ppm were attributed to the *Z* (7–5%) and *E* (93–95%) isomers, respectively. These signals were found at δ 13.51–13.19 (*Z*, 79–85%) and at δ 10.53–10.44 ppm (*E*, 21–15%) in the spectra of the 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones. Duplicated signals were not observed for the carbons, probably due to their low solubility.

Only one signal was observed for all hydrogens and carbons in the NMR spectra of complexes (1–6). The signals of $\text{N}(3)\text{-H}$ were absent in the spectra of 1–6, in accordance with the presence of anionic ligands upon deprotonation. In the spectra of 1–6 the signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free thiosemicarbazones. Similarly, the signals of $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{S}$ and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ chelating system. Hence in 1–6 the thiosemicarbazones adopt the *E* configuration, as confirmed by the crystal structures of complexes (1) and (2) (see Section 3.3).

3.3. X-ray diffraction analysis

The atom arrangements and atom numbering scheme for complexes (1) and (2) are shown in Fig. 2, while crystal data and refinement results are listed in Table 1. The crystal structure of $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{OClPh}$ has been previously determined by some of us [48]. Tables 2 and 3 present selected intramolecular bond distances and angles for $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{OClPh}$ [48], and complexes (1) and (2).

The distances and angles in both complexes are similar. In 1 and 2 the antimony(III) center is coordinated to a tridentate anionic thiosemicarbazone and two chloride ions.

The chlorine atoms are in a *trans* arrangement to each other with a $\text{Cl}(1)\text{-Sb}(1)\text{-Cl}(2)$ angle of $162.67(3)^\circ$ for 1 and $162.59(3)^\circ$ for 2. In complexes (1) and (2) the $\text{N}(1)\text{-Sb}(1)\text{-N}(2)$ and $\text{N}(2)\text{-Sb}(1)\text{-S}(1)$ angles of ca. $69.44(9)\text{-}69.31(9)^\circ$ in (1) and $76.51(6)\text{-}76.42(7)^\circ$ in (2) deviate markedly from the ideal value of 90° , probably due to the spatial requirements of the ligand chelating system. There is a slight shortening of the bond distance between $\text{Sb}(\text{III})$ and the imine nitrogen (2.238(2) and 2.240(3) Å) compared to the distance between $\text{Sb}(\text{III})$ and the hetero-aromatic nitrogen (2.367(3) and 2.358(3) Å). Similar feature was observed in related antimony complexes [42,43].

A twisting of approximately 180° in the $\text{N}(3)\text{-C}(8)$ bond of the thiosemicarbazone to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Therefore, the thiosemicarbazone conformation varies from *EE* when free [48] to *EZ* in the complexes. Hence some angles undergo significant changes upon coordination. The $\text{N}(2)\text{-N}(3)\text{-C}(8)$ angle goes from $118.2(2)$ and $118.9(2)^\circ$ in $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{OClPh}$ [48] to $116.4(2)^\circ$ in 1; the $\text{N}(4)\text{-C}(8)\text{-S}(1)$ angle varies from $124.3(2)$ and $124.1(2)^\circ$ in $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{OClPh}$ to $114.8(2)^\circ$ in 1.

The expected lengthening of the $\text{C}(8)\text{-S}(1)$ bond from 1.654(3) Å in $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{OClPh}$ [48] to 1.745(3) Å in 1, together with the shortening of the $\text{N}(3)\text{-C}(8)$ bond from 1.359(3) and 1.351(3) Å in $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{OClPh}$ to 1.301(4) Å in 1 were observed. Therefore the $\text{C}(8)\text{-S}(1)$ bond changes from a double to a predominantly single bond whereas $\text{N}(3)\text{-C}(8)$ acquires some double bond character due to deprotonation at $\text{N}(3)$ and formation of a highly delocalized system.

Details of hydrogen bonds are listed in Table 4. The intermolecular hydrogen interactions are weak, with the $\text{N}(4)\text{-H}(4\text{A})\cdots\text{Cl}(1)^{\text{i}}$ angle of 143.2° for 1 and the $\text{N}(4)\text{-H}(4\text{A})\cdots\text{Cl}(2)^{\text{ii}}$ angle of 143.3° for 2 [symmetry code: i: $3/2 - x, 1/2 + y, z$; ii: $-x + 1/2, y - 1/2, z$]. In the packing of complexes (1) and (2) inter-

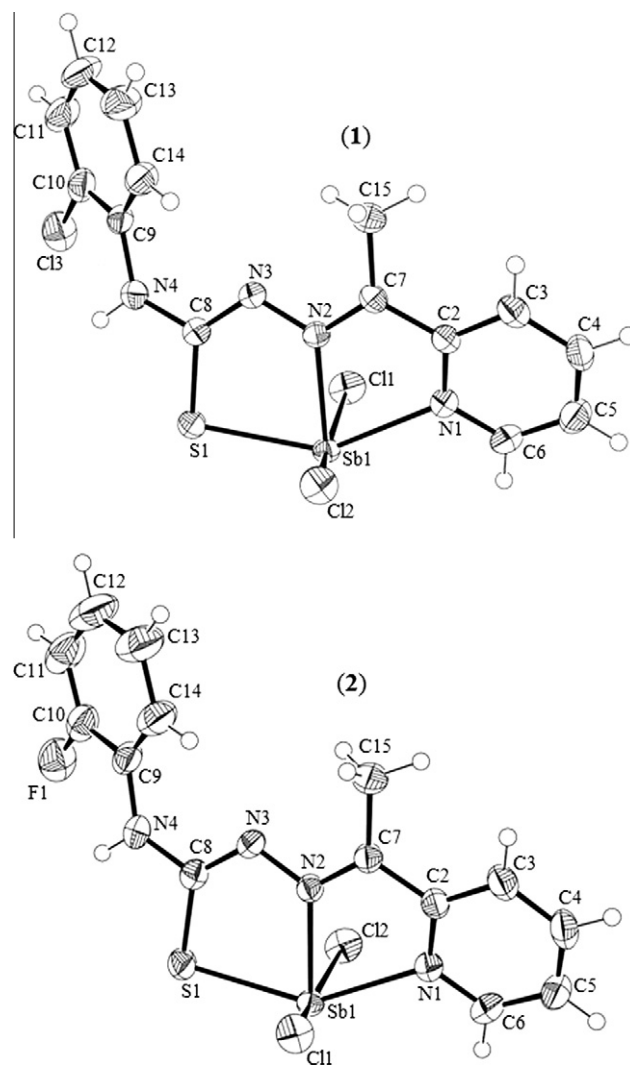


Fig. 2. Atom arrangement and atom numbering scheme for $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oClPh})\text{Cl}_2]$ (1) and $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{oFPh})\text{Cl}_2]$ (2). For purposes of clarity, the hydrogen atoms have been omitted. Probability ellipsoids are drawn at the 50% level. Hydrogens on nitrogens are drawn as spheres of arbitrary radii.

molecular short-contacts occur between $\text{Sb}(\text{III})$ and $\text{Cl}(2)$ for 1 and $\text{Cl}(1)$ for 2 (sum of van der Waals radii less than 0.3 Å) giving rise to a pseudo-octahedral environment. The short-contact between $\text{Sb}(\text{III})$ and Cl and the $\text{N}(4)\text{-H}$ hydrogen bonds interactions give rise to tri-dimensional networks.

3.4. Anti-trypanosomal activity

Table 5 shows the effect of the thiosemicarbazone ligands and their corresponding antimony complexes on the growth of the epimastigote form of *T. cruzi* at day 5 of exposure ($\text{ID}_{50,T.cruzi}$), together with their cytotoxicities. $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oClPh}$ and complexes (4) and (1) were the most trypanosomicidal compounds being 55- to 70-fold more active than the reference drug, nifurtimox, Nfx. The remaining compounds were excellent inhibitors of *T. cruzi* growth under the assayed conditions. Coordination to antimony(III) improved the thiosemicarbazones' activity in complexes (1) and (5), the most notorious change being the case of $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ for which coordination to antimony(III) in 1 resulted in a 2-fold enhancement of the anti-*T. cruzi* activity. Coordination of $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{oFPh}$ to antimony(III) in complex (5) resulted in 1.4-fold increase in activity. The effect of antimony chloride was evaluated and its low bioactiv-

Table 1Crystal data and structure refinement for [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**) and [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**).

Compound	[Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂] (1)	[Sb(2Ac4oFPh)Cl ₂] (2)
Empirical formula	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₃ N ₄ SSb	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ FN ₄ SSb
Formula weight (g mol ⁻¹)	496.44	479.99
T (K)	293(2)	293(2)
λ (Å)	0.71073	0.71073
Crystal system	orthorhombic	orthorhombic
Space group	<i>Pbca</i>	<i>Pbca</i>
Crystal size (mm)	0.26 × 0.22 × 0.20	0.32 × 0.32 × 0.20
<i>Unit cell dimensions</i>		
<i>a</i> (Å)	8.1260(2)	8.1613(3)
<i>b</i> (Å)	14.9117(3)	14.9096(6)
<i>c</i> (Å)	29.3376(8)	28.4736(10)
α (°)	90	90
β (°)	90	90
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	3554.91(15)	3464.7(2)
<i>Z</i>	8	8
Calculated density (mg m ⁻³)	1.855	1.840
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	2.123	2.033
<i>F</i> (000)	1936	1872
θ range for data collection (°)	2.78–26.37	2.82–26.37
Limiting indices	−7 ≤ <i>h</i> ≤ 10 −18 ≤ <i>k</i> ≤ 18 −35 ≤ <i>l</i> ≤ 36	−10 ≤ <i>h</i> ≤ 8 −18 ≤ <i>k</i> ≤ 17 −35 ≤ <i>l</i> ≤ 35
Reflections collected/ unique (<i>R</i> _{int})	14228/3634 (0.0361)	15223/3542 (0.0275)
Completeness	θ = 26.37° 99.9%	θ = 26.37° 99.9%
Absorption correction	multi-scan	multi-scan
Data/restraints/ parameters	3634/0/210	3542/0/209
Goodness-of-fit (GOF) on <i>F</i> ²	1.074	1.098
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0267, <i>wR</i> ₂ = 0.0629	<i>R</i> ₁ = 0.0283, <i>wR</i> ₂ = 0.0599
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0375, <i>wR</i> ₂ = 0.0693	<i>R</i> ₁ = 0.0373, <i>wR</i> ₂ = 0.0618
Largest difference in peak and hole (e Å ⁻³)	0.957 and −0.699	0.505 and −1.129

Table 2Selected bond distances (Å) for H2Ac4oClPh [48], [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**) and [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**).

Atoms	H2Ac4oClPh ^{a,b}		1	2
C(7)–N(2)	1.281(3)	1.278(3)	1.229(4)	1.301(4)
N(2)–N(3)	1.362(3)	1.361(3)	1.365(3)	1.370(4)
N(3)–C(8)	1.359(3)	1.351(3)	1.301(4)	1.306(4)
C(8)–S(1)	1.654(3)	1.654(3)	1.745(3)	1.738(4)
C(8)–N(4)	1.328(4)	1.336(3)	1.350(4)	1.355(4)
Sb(1)–N(1)	–	–	2.367(3)	2.358(3)
Sb(1)–N(2)	–	–	2.238(2)	2.240(3)
Sb(1)–S(1)	–	–	2.5329(8)	2.5378(9)
Sb(1)–Cl(1)	–	–	2.5327(8)	2.6198(9)
Sb(1)–Cl(2)	–	–	2.6172(8)	2.5285(9)

^a There are two molecules in the asymmetric unit.^b Ref. [48].

ity indicates that it did not present anti-*T. cruzi* activity *per se* in the assayed conditions. Comparison of the therapeutic indexes (TI = Cytotoxicity/ID₅₀) reveals that upon coordination of H2Ac4oClPh to antimony(III) in complex (**1**), TI goes from 10.58 to 14.35. However, the best values of TI were found for H2Bz4oClPh (TI = 1240) and H2Ac4oNO₂Ph (TI = 773).

Table 3Selected angles (°) for H2Ac4oClPh [48], [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (**1**) and [Sb(2Ac4oFPh)Cl₂] (**2**).

Atoms	H2Ac4oClPh ^{a,b}		1	2
C(7)–N(2)–N(3)	119.1(2)	118.7(2)	116.2(2)	115.7(3)
N(2)–N(3)–C(8)	118.2(2)	118.9(2)	116.4(2)	115.9(3)
N(3)–C(8)–S(1)	121.0(2)	121.5(2)	126.9(2)	127.3(3)
N(3)–C(8)–N(4)	114.7(2)	114.4(2)	118.2(3)	117.4(3)
N(4)–C(8)–S(1)	124.3(2)	124.1(2)	114.8(2)	115.2(3)
N(1)–Sb(1)–N(2)	–	–	69.44(9)	69.31(9)
N(1)–Sb(1)–Cl(1)	–	–	83.21(7)	83.87(7)
N(1)–Sb(1)–Cl(2)	–	–	84.00(7)	82.56(7)
N(2)–Sb(1)–Cl(1)	–	–	82.46(6)	81.89(7)
N(2)–Sb(1)–Cl(2)	–	–	82.12(6)	83.14(7)
N(1)–Sb(1)–S(1)	–	–	145.91(7)	145.63(7)
N(2)–Sb(1)–S(1)	–	–	76.51(6)	76.42(7)
S(1)–Sb(1)–Cl(1)	–	–	90.93(3)	94.04(3)
S(1)–Sb(1)–Cl(2)	–	–	93.13(3)	91.04(3)
Cl(1)–Sb(1)–Cl(2)	–	–	162.67(3)	162.59(3)

^a There are two molecules in the asymmetric unit.^b Ref. [48].

In a previous work [43] we studied the anti-trypanosomal effect of 2-formylpyridine-*N*(4)-phenyl thiosemicarbazone (H2Fo4Ph), 2-acetylpyridine-*N*(4)-phenyl thiosemicarbazone (H2Ac4Ph) and 2-benzoylpyridine-*N*(4)-phenyl thiosemicarbazone (H2Bz4Ph) together with their antimony(III) complexes against epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Comparison of the anti-trypanosomal activities of the compounds is not possible because two different epimastigote strains were employed. However, the same cytotoxicity tests were carried out. The compounds investigated in the present work proved to be much less cytotoxic than H2Fo4Ph, H2Ac4Ph, H2Bz4Ph and their antimony(III) complexes.

3.5. SAR studies

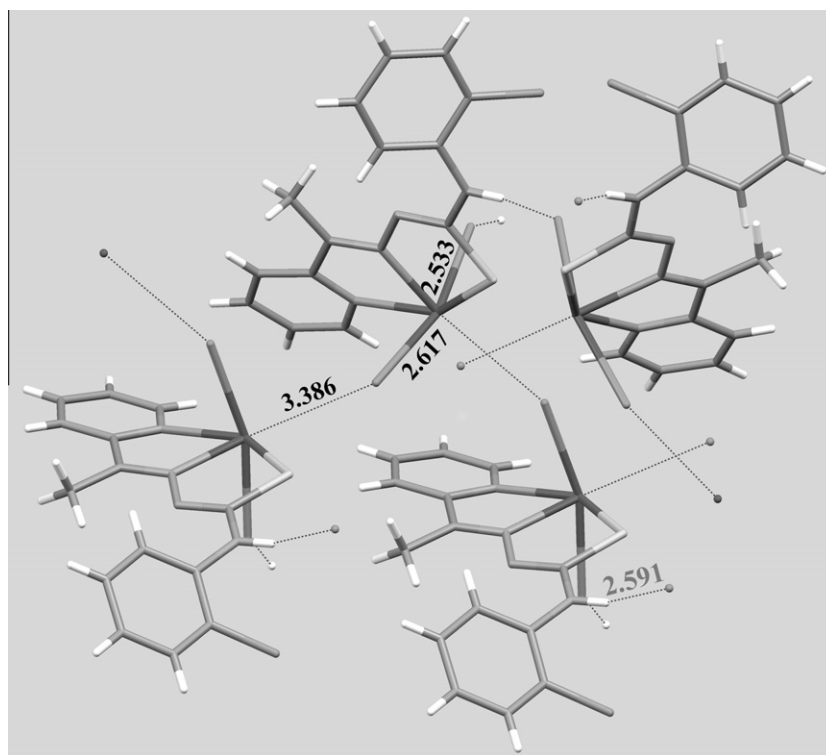
SAR theoretical calculations were performed in order to investigate physico-chemical properties that may be related to the anti-*T. cruzi* activity of the studied compounds. Properties of interest in this study were the highest occupied molecular orbital ε(HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital ε(LUMO) energies, and the dipole moments (*D*), which were correlated to the determined ID₅₀ values. The HOMO and LUMO energies are related to ionization potential and electron affinity, respectively. These frontier orbitals are associated to the molecule's reactivity. HOMO energy is closely related to reactivity to electrophilic attack while LUMO energy is closely related to reactivity to nucleophilic attack. Additionally, the dipole moment may give some insight on the degree of hydrophobicity/hydrophilicity of the compounds.

The anti-*T. cruzi* activities of the thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes are displayed in Table 5 and their physico-chemical parameters are shown in Table 6. Physico-chemical properties were obtained for the *E* and *Z* isomers of thiosemicarbazones and for the complexes.

Attempting to establish some correlation between physico-chemical properties and anti-trypanosomal activity, a simple correlation matrix (data not shown) was built containing the ID₅₀ values for the thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes together with the physico-chemical parameters for each compound. For the thiosemicarbazones the possibility of existence of the *E* and *Z* isomers was considered. No correlation was observed between the activity and the physico-chemical parameters considering either the *E* or *Z* forms of the thiosemicarbazones separately or the major isomers (*E* for the acetylpyridine-derived thiosemicarbazones and *Z* for the benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones). No correlations were found as well between the anti-*T. cruzi* activity of the antimony(III) complexes and the physico-

Table 4Hydrogen bonds [\AA and $^\circ$] in the structure of $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**) and $[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (**2**).

Compounds	D–H...A	$d(\text{D–H})$	$d(\text{H...A})$	$d(\text{D...A})$	$\angle(\text{DHA})$
$[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (1)	N(4)–H(4A)...Cl(2) ⁱ	0.86	2.58	3.312	143.3
$[\text{Sb}(\text{2Ac4oFPh})\text{Cl}_2]$ (2)	N(4)–H(4A)...Cl(1) ⁱⁱ	0.86	2.59	3.320	143.2

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: (i) $-x + 1/2, y - 1/2, z$; (ii) $3/2 - x, 1/2 + y, z$.**Fig. 3.** Molecular packing of $[\text{Sb}(\text{2Ac4oClPh})\text{Cl}_2]$ (**1**).**Table 5***In vitro* anti-*T. cruzi* activity for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes.

Compound	$\text{ID}_{50,T.cruzi}^{a,b}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Cytotoxicity ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
H2Ac4oClPh	0.310	3.28
1	0.140	2.01
H2Ac4oFPh	0.280	3.47
2	0.250	0.521
H2Ac4oNO ₂ Ph	0.410	317.1
3	0.440	0.493
H2Bz4oClPh	0.110	136.3
4	0.110	1.79
H2Bz4oFPh	0.360	2.85
5	0.260	1.84
H2Bz4oNO ₂ Ph	0.430	2.65
6	0.490	1.76
SbCl ₃	4.850	21.9
Nfx	7.700	3.48

^a $\text{ID}_{50,T.cruzi}$: doses that inhibits 50% of epimastigote form of *T. cruzi*, Tulahuen 2, growth.^b Results are the mean values of three different experiments with a SD less than 10% in all cases.

chemical properties. The small differences in activity among the studied compounds could at least in part explain the lack of correlation.

Since a larger range was obtained for cytotoxicity, a correlation matrix was built containing the cytotoxicities of the compounds together with their physico-chemical properties. A direct

Table 6

Calculated physico-chemical properties and experimental MIC values for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes.

Compound	$\epsilon(\text{HOMO})$ (u.a.) ^a	$\epsilon(\text{LUMO})$ (u.a.)	Dipole (D)
H2Ac4oClPh	–0.2035 (<i>E</i> isomer)	–0.0821 (<i>E</i> isomer)	3.120 (<i>E</i> isomer)
	–0.2033 (<i>Z</i> isomer)	–0.0704 (<i>Z</i> isomer)	5.700 (<i>Z</i> isomer)
H2Ac4oFPh	–0.2026 (<i>E</i> isomer)	–0.0583 (<i>E</i> isomer)	2.843 (<i>E</i> isomer)
	–0.2015 (<i>Z</i> isomer)	–0.0693 (<i>Z</i> isomer)	5.874 (<i>Z</i> isomer)
H2Ac4oNO ₂ Ph	–0.2101 (<i>E</i> isomer)	–0.1021 (<i>E</i> isomer)	0.513 (<i>E</i> isomer)
	–0.2091 (<i>Z</i> isomer)	–0.0891 (<i>Z</i> isomer)	4.279 (<i>Z</i> isomer)
H2Bz4oClPh	–0.2018 (<i>E</i> isomer)	–0.0614 (<i>E</i> isomer)	3.187 (<i>E</i> isomer)
	–0.2041 (<i>Z</i> isomer)	–0.0725 (<i>Z</i> isomer)	5.581 (<i>Z</i> isomer)
H2Bz4oFPh	–0.2010 (<i>E</i> isomer)	–0.0600 (<i>E</i> isomer)	3.440 (<i>E</i> isomer)
	–0.2024 (<i>Z</i> isomer)	–0.0715 (<i>Z</i> isomer)	5.588 (<i>Z</i> isomer)
H2Bz4oNO ₂ Ph	–0.2079 (<i>E</i> isomer)	–0.0987 (<i>E</i> isomer)	1.846 (<i>E</i> isomer)
	–0.1989 (<i>Z</i> isomer)	–0.0543 (<i>Z</i> isomer)	6.162 (<i>Z</i> isomer)
1	–0.2430	–0.1992	21.8899
2	–0.2452	–0.2020	22.750
3	–0.2450	–0.1967	20.692
4	–0.2380	–0.1968	21.008
5	–0.2385	–0.1956	23.334
6	–0.2407	–0.2002	22.336

^a u.a. = 27.221 eV = 627.51 Kcal mol^{–1}.

correlation was found between the dipole moment and cytotoxicity ($R = 0.73$) for the *E* isomers of the thiosemicarbazones. Hence, higher values of dipole moment contribute to higher cytotoxicity.

For the *Z* isomers there was a direct correlation between the HOMO energy, $\varepsilon(\text{HOMO})$, and cytotoxicity ($R = 0.90$) and between LUMO energy, $\varepsilon(\text{LUMO})$, and cytotoxicity ($R = 0.81$). In addition, a direct correlation was found between the dipole moment and cytotoxicity ($R = 0.92$) for the *Z* isomers. Considering only the major species, there was a direct correlation between $\varepsilon(\text{HOMO})$ and $\varepsilon(\text{LUMO})$ and cytotoxicity ($R = 0.89$ and $R = 0.80$, respectively). Hence, higher reactivity seems to result in higher cytotoxicity.

An inverse correlation between the HOMO energies of the antimony(III) complexes and their cytotoxicity against *T. cruzi* was also found ($R = -0.77$).

4. Conclusions

Among the thiosemicarbazones the *ortho*-nitro derivatives proved to be the less active compounds. The anti-trypanosomal activity followed the order $\text{H2Ac4oClPh} \sim \text{H2Ac4oFPh} > \text{H2Ac4oNO}_2\text{Ph}$ for the 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones and $\text{H2Bz4oClPh} > \text{H2Bz4oFPh} > \text{H2Bz4oNO}_2\text{Ph}$ for the 2-benzoylpyridine-derived analogues. For the complexes with both series of thiosemicarbazones the order of activity was the same as that observed for the 2-benzoylpyridine-derived ligands. Coordination to antimony(III) resulted in lower values of ID_{50} in the cases of complexes **(1)** and **(5)**.

Comparison of the therapeutic indexes ($\text{TI} = \text{Cytotoxicity}/\text{ID}_{50}$) reveals that upon coordination of H2Ac4oClPh to antimony(III) in complex **(1)**, TI goes from 10.58 to 14.35. However, the best values of TI were found for H2Bz4oClPh ($\text{TI} = 1240$) and $\text{H2Ac4oNO}_2\text{Ph}$ ($\text{TI} = 773$).

Coordination to antimony(III) resulted in more active compounds in the cases of **1** and **5**. However, the complexes were in general more toxic than the free thiosemicarbazones. In fact, although antimony compounds are used in the treatment of *leishmania* diseases, antimony(III) compounds are known to be toxic and to present cytotoxic activity against tumor cells [42]. In addition, antimony(III) seriously compromises thiol homeostasis and this may be one of the reasons for its toxicity [49].

SAR studies did not allow the establishment of correlations between the anti-trypanosomal activity and physico-chemical parameters, but correlations were found between the cytotoxicities of the compounds and their physico-chemical properties.

Antimony(III) shows anti-*leishmania* activity, due to its coordination to trypanothione reductase (TR), an enzyme which is essential for the parasite survival and virulence, and which is absent in mammalian cells [50]. Since TR also occurs in *trypanosoma*, being responsible for various trypanosome protections against free radicals, many authors have indicated TR to be one of the most promising targets for research on trypanocidal drugs [51]. Thus antimony(III) could act by targeting *trypanosoma*'s TR.

Although we did not investigate the mechanism of action of the antimony(III) complexes, it may be suggested that enhancement of the anti-trypanosomal activity of thiosemicarbazones on coordination to antimony(III) in complexes **(1)** and **(5)** could be due to a synergistic effect involving both antimony(III) and the ligand. Although the antimony(III) salt did not show anti-trypanosomal activity in the tested conditions, the increased anti-trypanosomal effect of complexes **(1)** and **(5)** could be due to the thiosemicarbazones acting as carriers to transport the metal into the cell.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, PROSUL/CNPq, RIDIMEDC-HAG-CYTED, and INCT-INOFAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6). W.R.R. and R.P.D. also would like to thank the INCT-CATÁLISE and FAPEMIG for the financial support.

Appendix A. Supplementary data

CCDC 808741 and 808742 contain the supplementary crystallographic data for complexes **(1)** and **(2)**. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk

References

- [1] World Health Organization, 2009. 10 Facts on neglected tropical diseases web page. Available from: http://www.who.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/en/index.html (accessed July 2010).
- [2] A. Fieck, I. Hurwitz, A.S. Kang, R. Durvasula, *Exp. Parasitol.* 125 (2010) 342.
- [3] N.R. Sturm, D.A. Campbell, *Acta Trop.* 115 (2010) 35.
- [4] W. Porcal, P. Hernández, L. Boiani, M. Boiani, A. Ferreira, A. Chidichimo, J.J. Cazzulo, C. Olea-Azar, M. González, H. Cerecetto, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 6995.
- [5] H. Cerecetto, M. González, *Pharmaceuticals* 3 (2010) 810.
- [6] M.M. De Mecca, E.G. Diaz, J.A. Castro, *Toxicol. Lett.* 136 (2002) 1.
- [7] H. Cerecetto, M. González, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2002) 1187.
- [8] E.N. Kaneshima, M.M.A. De Castro-Prado, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 (2005) 325.
- [9] M. Cabrera, M.L. Lavaggi, P. Hernández, A. Merlino, A. Gerpe, W. Porcal, M. Boiani, A. Ferreira, A. Monge, A.L. De Ceram, M. González, H. Cerecetto, *Toxicol. Lett.* 190 (2009) 140.
- [10] A. Perez-Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. De Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467.
- [11] J. Easmon, G. Heinisch, W. Holzer, B. Rosenwirth, *J. Med. Chem.* 35 (1992) 3288.
- [12] I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, *Polyhedron* 26 (2007) 3263.
- [13] A. Merlino, D. Benitez, S. Chavez, J. Da Cunha, P. Hernández, L.W. Tinoco, N.E. Campillo, J.A. Páez, H. Cerecetto, M. González, *Med. Chem. Commun.* 1 (2010) 216.
- [14] N. Bharti, K. Husain, M.T.G. Garza, D.E. Cruz-Veja, J. Castro-Garza, B.D. Mata-Cardenas, F. Naqvi, A. Azam, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 3475.
- [15] D.L. Klayman, J.F. Bartosevich, T.S. Griffin, C.J. Mason, J.P. Scovill, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 855.
- [16] A. Pérez-Rebolledo, 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] C.B.M. Tester-Dalderup, *Antiprotozoal drugs*, in: M.N.G. Dukes (Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs*, 13th ed., Amsterdam, 1996.
- [20] E.R.T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 217.
- [21] F.R. Opperdoes, J.-P. Szikora, *Mol. Biochem. Parasitol.* 147 (2006) 193.
- [22] D.X. West, N.M. Kozub, G.A. Bain, *Transition Met. Chem.* 21 (1996) 52.
- [23] G.L. Parrilha, J.G. Da Silva, L.F. Gouveia, A.K. Gasparoto, R.P. Dias, W.R. Rocha, D.A. Santos, N.L. Speziali, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 1473.
- [24] CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38. SCALE3 ABSPACK Scaling Algorithm, CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.32.38.
- [25] G.M. Sheldrick, *SHELXS-97*, Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [26] G.M. Sheldrick, *SHELXL-97*, Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [27] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [28] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837.
- [29] G. Alvarez, B. Aguirre-López, J. Varela, M. Cabrera, A. Merlino, G.V. López, M.L. Lavaggi, W. Porcal, R. Di Maio, M. González, H. Cerecetto, N. Cabrera, R. Pérez-Montfort, M.T. De Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5767.
- [30] A. Gerpe, L. Boiani, P. Hernández, M. Sortino, S. Zacchino, M. González, H. Cerecetto, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 2154.
- [31] R.G. Parr, W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
- [32] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [33] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [34] W.J. Stevens, M. Krauss, H. Basch, P.G. Jasien, *Can. J. Chem.* 70 (1992) 612.
- [35] T.R. Cundari, W.J. Stevens, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5555.
- [36] N.P. Labello, A.M. Ferreira, H.A. Kurtz, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1464.
- [37] N.P. Labello, A.M. Ferreira, H.A. Kurtz, *Int. J. Quantum Chem.* 106 (2006) 3140.
- [38] M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S.J. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery, *J. Comput. Chem.* 14 (1993) 1347.
- [39] J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2301.
- [40] I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1870.

- [41] H.D. Yin, J. Zhai, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 339.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fourth ed., Wiley, New York, 1986.
- [45] A.M.B. Bastos, A.F.C. Ancântara, H. Beraldo, *Tetrahedron* 61 (2005) 7045.
- [46] 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.
- [47] A. Pérez-Rebolledo, G.M. Da Silva, N.L. Speziali, O.E. Piro, E.E. Castellano, J.D. Ardisson, H. Beraldo, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 3919.
- [48] J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Da Silva, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671.
- [49] S. Wyllie, A.H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 257.
- [50] P. Baiocco, G. Colotti, S. Franceschini, A. Ilari, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 2603.
- [51] G. Aguirre, E. Cabrera, H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, G. Seoane, A. Duffaut, A. Denicola, M.J. Gil, V. Martínez-Merino, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 421.

Coordination of lapachol to bismuth(III) improves its anti-inflammatory and anti-angiogenic activities

Gabrieli L. Parrilha · Rafael P. Vieira · Paula P. Campos ·
Grácia Divina F. Silva · Lucienir P. Duarte ·
Sílvia P. Andrade · Heloisa Beraldo

Received: 6 June 2011 / Accepted: 15 July 2011 / Published online: 6 August 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ was obtained with 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione, “lapachol” (HLp). Lapachol, $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ and BiCl_3 were evaluated in a murine model of inflammatory angiogenesis induced by subcutaneous implantation of polyether polyurethane sponge discs. Intraperitoneal (i.p.) administration of lapachol or $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ reduced the hemoglobin content in the implants suggesting that reduction of neo-vascularization was caused by lapachol. In the *per os* treatment only $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ decreased the hemoglobin content in the implants. Likewise, *N*-acetylglucosaminidase (NAG) activity decreased in the implants of the groups i.p. treated with lapachol and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ while in the *per os* treatment inhibition was observed only for $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$. Histological analysis showed that the components of the fibro-vascular tissue (vascularization and inflammatory cell population) were decreased in lapachol- and complex-treated groups. Our results suggest that both lapachol and

$[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ exhibit anti-angiogenic and anti-inflammatory activities which have been attributed to the presence of the lapachol ligand. However, coordination to bismuth(III) could be an interesting strategy for improvement of lapachol’s therapeutic properties.

Keywords Lapachol · Bismuth(III) complex · Sponge implants · Angiogenesis · Inflammation

Introduction

Inflammation, angiogenesis and remodeling are self-limiting processes under normal healing conditions (Mendes et al. 2009a). Angiogenesis is a fundamental process to normal and abnormal tissue growth and repair, which consists of recruiting endothelial cells toward an angiogenic stimulus. However, if one or more of those processes are maintained further injury is caused resulting in chronic inflammatory conditions (Gong and Koh 2010; Mendes et al. 2009a; Walsh and Pearson 2001). Chronic inflammatory processes such as rheumatoid arthritis, Crohn’s disease and psoriasis share these abnormal healing features. Thus, therapies that attenuate inflammatory angiogenesis and fibrotic processes are able to prevent progression and/or maintenance of chronic inflammatory conditions (Araújo et al. 2010; Xavier et al. 2010).

4-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione, “lapachol” (Fig. 1), is a naphthoquinone

G. L. Parrilha · R. P. Vieira · G. D. F. Silva ·
L. P. Duarte · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br

P. P. Campos · S. P. Andrade (✉)
Departamento de Fisiologia e Biofísica Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: andrades@icb.ufmg.br

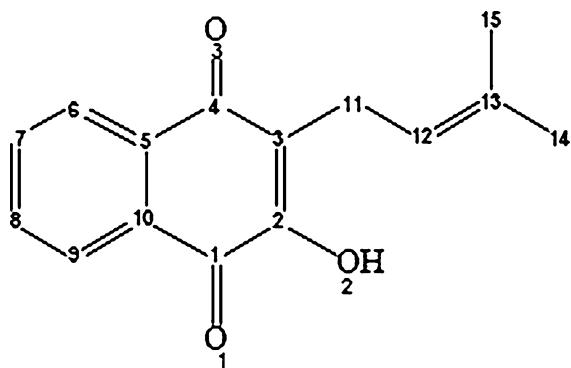


Fig. 1 Structure of 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione (Lapachol)

obtained from the heartwood of Brazilian *Tabebuia* trees (Bignoniaceae family) (Da Silva Júnior et al. 2011), which exhibits wide spectrum of biological activities, such as antitumoral, antimicrobial and antiprotozoal activities (Eyong et al. 2008; Oliveira et al. 2010). Anti-inflammatory activity was also demonstrated in studies with animal models (De Almeida et al. 1990; Lira et al. 2008).

Bismuth has long been associated with Medicine. The first full account of the internal administration of a bismuth compound was in 1786 by Louis Odier for the treatment of dyspepsia. Currently, the major medicinal use of bismuth compounds is for treating gastrointestinal disorders (Briand and Burford 1999; Yang and Sun 2007). The roles of these compounds in gastric and duodenal ulcer therapy and the eradication of *Helicobacter pylori*—a bacterium associated with the pathogenesis of gastro-duodenal ulcers—have been extensively investigated (Sadler et al. 1999; Severi et al. 2009). Pharmacological studies suggest that the treatment and prevention of ulcers by colloidal bismuth subcitrate (CBS) involve antimicrobial action together with fortification of gastric mucus and the stimulation of cytoprotective processes (Hall 1989; Lee 1991). Besides bismuth's activities on gastrointestinal disorders, investigations on the anti-inflammatory activity of bismuth subgallate (BSG) have been reported (Lin et al. 2004). Results suggest that BSG has an effect on suppressing nitric oxide and prostaglandin E₂, important mediators in inflammatory processes.

In the present work we studied the effects of lapachol (HLp), its bismuth(III) complex [Bi(Lp)₂]Cl and BiCl₃ in an experimental model of inflammatory

angiogenesis induced by a sponge implant in order to characterize probable synergistic effects between the metal and the naphthoquinone on murine models. The effects of the compounds on the angiogenic and inflammatory components of the fibro-vascular tissue were investigated.

Experimental

Materials and methods

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.

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

Isolation of lapachol

Lapachol was isolated from *Tabebuia* sp. using a method described by Ferreira (1996). The sawdust of *Tabebuia* sp. wood (100 g) was treated with 300 ml of 10% Na₂CO₃ aqueous solution, and maintained under stirring during 5 min. The red solution was filtered and the residue submitted to another extraction using 400 ml of sodium carbonate solution, and stirred for 10 min. The filtrate was carefully treated with concentrated HCl, drop by drop with constant agitation, until pH < 5, which is easily identified by the change of color from red to yellow. The extraction mixture was stirred for 30 min, and filtered in a Büchner funnel, under vacuum. After dried, the obtained solid material was washed with cold distilled water. The yellowish solid material (900 mg) was submitted to silica gel (70–230 Mesh, Merck) column chromatography, eluted with chloroform. The obtained yellow solid was re-crystallized with hexane to give pure yellow crystals (350 mg). The yellow crystalline material was chemically identified as lapachol through comparison with authentic sample using thin layer chromatography

and mixed melting point. Melting point: 139–141°C. IR (cm⁻¹): 3352 ν (OH), 1661 and 1639 ν (C=O), 1450–1591 ν (C=C); ¹H NMR (δ ppm) 1.68 and 1.79 (s, 2 Me), 3.3 (d, CH₂–CH=) and 5.2 (t, CH₂–CH=).

Synthesis of the bismuth(III) complex

The bismuth(III) complex was obtained by stirring under reflux an ethanol solution of lapachol (HLp) with bismuth chloride, BiCl₃, together with sodium acetate, NaCH₃COO, in 3:1:3 lapachol:BiCl₃:NaCH₃COO molar ratio. The obtained solid was filtered off, washed with ethanol and diethylether and then dried.

[Bi(Lp)₂]Cl

Orange solid. Anal. Calc. for C₃₀H₂₆O₆ClBi (726.96 g mol⁻¹): C 49.57%; H 3.60%. Found: C 49.01%; H 3.60%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol l⁻¹ DMF): 77.35 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν (C=O) 1634, 1623, ω (C–H) 729. IR (CsI/Nujol, cm⁻¹): ν (M–O) 489, 472. Signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.87 (1H, H9), 7.80 (1H, H6), 7.71 (1H, H8), 7.57 (1H, H7), 5.11 (1H, H12), 3.10 (2H, H11), 1.65 (3H, H14), 1.51 (3H, C15). Yield: 77%.

Anti-angiogenic activity

Animals

Male Swiss mice 7–8 weeks (20–30 g body weight) were used in these experiments. The mice were provided by the Central Animal Facility at the Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil. The animals were housed individually and provided with chow pellets and water ad libitum. The light/dark cycle was 12:12 h with lights on at 7:00 a.m. and lights off at 7:00 p.m. Efforts were made to avoid all unnecessary distress to the animals. Housing, anaesthesia and post-operative care concurred with the guidelines established by our local Institutional Animal Welfare Committee.

Preparation of sponge discs and implantation

Polyether–polyurethane sponge (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) was used as the implanted material. The implants were discs, 5 mm thick × 8 mm diameter and were soaked overnight in 70% v/v ethanol and

sterilized by boiling in distilled water for 15 min before implantation. For that, the animals were anaesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (1 mg kg⁻¹; i.p. Aldrich, USA), the dorsal hair shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted into a subcutaneous pouch, which had been made with curved artery forceps through a 1 cm long dorsal mid-line incision. Post-operatively, the animals were monitored for any signs of infection at the operative site, discomfort or distress; any showing such signs were immediately humanely killed.

Intraperitoneal (i.p.) and per os administrations of the compounds

Suspensions of lapachol, BiCl₃ and bismuth(III) complex [Bi(Lp)₂]Cl were prepared in tween 80.6% in saline (i.p. route) and in carboxymethylcellulose (CMC) 0.5% in saline (*per os* route). Lapachol 25 mg kg⁻¹ day⁻¹ was used as positive control (Bezerra et al. 2008). Doses of BiCl₃ (16.3 mg kg⁻¹ day⁻¹) and [Bi(Lp)₂]Cl (37.7 mg kg⁻¹ day⁻¹) were equimolar to lapachol 25 mg kg⁻¹ day⁻¹. In *per os* treatment, doses of the compounds ten-fold less were also used to show dose response effects. Higher doses were not used since high doses of lapachol (80 and 100 mg kg⁻¹) administered orally present toxic effects (Maeda et al. 2008).

Treatments started on the day of sponge implantation and finished after 8 days. Control groups received vehicles in the same schedule. The treatment was well tolerated by the animals over the experimental period.

Tissue extraction and determination of myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase activities

The number of neutrophils in implants was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity as previously described (Ferreira et al. 2004; Mendes et al. 2009a). The implants for this set of experiments were removed 9 days post-implantation after daily doses of the compounds. After excision they were weighed, homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 mol l⁻¹ NaCl, 0.02 mol l⁻¹ NaPO₄, 0.015 mol l⁻¹ NaEDTA), centrifuged at 12,000 × g for 10 min. The pellets were then re-suspended in 0.05 mol l⁻¹ NaPO₄

buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) followed by three freeze–thaw cycles using liquid nitrogen. MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine ($1.6 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) and H_2O_2 ($0.3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). The reaction was terminated by the addition of 50 μl of H_2SO_4 (4 mol l^{-1}). Results were expressed as change in OD per gram of wet tissue.

The infiltration of mononuclear cells into the implants was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme *N*-acetylglucosaminidase (NAG) present in high levels in activated macrophages (Ferreira et al. 2004; Mendes et al. 2009a). The implants removed 9 days post-implantation were homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega) and centrifuged ($3,000 \times g$; 10 min at 4°C). Samples (100 μl) of the resulting supernatant were incubated for 10 min with 100 μl of *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 mol l^{-1} citric acid, $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$; pH 4.5) to yield a final concentration of $2.24 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. The reaction was stopped by the addition of 100 μl of 0.2 mol l^{-1} glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. Results were expressed as nmol mg^{-1} wet tissue.

Hemoglobin extraction

The extent of vascularization of the sponge implants was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin method (Ferreira et al. 2004; Mendes et al. 2009a). At day 9 post-implantation, the animals were killed and the sponge implants carefully removed, dissected free from adherent tissue and weighed. Each implant was homogenized (Tekmar TR-10, OH) in 5 ml of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min. The supernatants were filtered through a 0.22 μm Millipore filter. The hemoglobin concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an ELISA plate reader and compared against a standard curve of hemoglobin. The content of hemoglobin in the implant was expressed as $\mu\text{g Hb per mg}$ wet tissue.

Histological analysis and staining

The sponge implants from separate groups of mice were excised carefully, dissected free of adherent tissue and fixed in formalin (10% w/v in isotonic saline). Sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and processed for light-microscopic studies.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SEM. Comparisons between the three groups (numbers as stated in the Figure legends; usually 5 to 13 animals) were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls correction factor for multiple comparisons as a post-test. Differences between means were considered significant when *P* values were <0.05 .

Results and discussion

Formation of the bismuth(III) complex

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Bi}(\text{L})_2]\text{Cl}$, in which two lapacholate anions are attached to the metal center.

Spectroscopic characterization

The band localized at 3352 cm^{-1} assigned to $\nu(\text{O-H})$ in the infrared spectrum of free lapachol disappears upon coordination, indicating deprotonation. The characteristic $\nu(\text{C=O})$ absorptions, found at 1661 and 1639 cm^{-1} in the spectrum of lapachol (Caruso et al. 2009; Martínez et al. 2003), shift to lower frequencies in the complex (1634 and 1623 cm^{-1}), in agreement with coordination through the oxygen atoms. The vibration attributed to an out-of-plane ring mode, $\omega(\text{C-H})$, at 724 cm^{-1} in the infrared spectrum of lapachol shifts to 729 cm^{-1} in the spectrum of the complex (Caruso et al. 2009). New bands at 489 and 472 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{M-O})$ stretching vibration (Nakamoto 1970).

The ^1H NMR spectra of lapachol and its bismuth(III) complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ were recorded in $\text{DMSO-}d_6$. The ^1H resonances were assigned on the

basis of chemical shifts and multiplicities. The ^{13}C NMR spectrum of the complex was not obtained due to its low solubility.

In the ^1H NMR spectrum of the complex the signals of all hydrogen atoms undergo shifts in relation to their position in free lapachol. However, the most significant shifts were observed for the aromatic hydrogens, suggesting coordination through the O(1) and O(2) oxygen atoms.

Measurement of the anti-angiogenic effect

In the i.p. treatment, the hemoglobin levels in the implants from vehicle-treated animals were $0.79 \pm 0.18 \mu\text{gHb mg}^{-1}$ wet tissue. Lapachol and the complex statistically reduced neo-vascularization of the implants, as detected by changes in the hemoglobin content (Fig. 2a). In both cases decreasing on hemoglobin content was approximately 50%. Since lapachol and complex groups did not present statistical difference between each other, results suggest that the reduction of neo-vascularization is caused by free lapachol in both experimental groups. Thus, the complex probably dissociates under in vivo conditions releasing lapachol molecules after i.p. administration. Decreasing on hemoglobin values was not observed in the implants from animals treated with BiCl_3 .

Hemoglobin levels in the implants from *per os* vehicle-treated animals were $0.72 \pm 0.06 \mu\text{gHb mg}^{-1}$ wet tissue (lapachol dose of $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$). After *per os* treatment with lapachol $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ only complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ statistically decreased the hemoglobin content in the implants (about 60%). Lapachol and BiCl_3 groups were unable to reduce neo-vascularization of the implants (Fig. 2b). *Per os* treatment was also performed with lapachol $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ to evaluate dose response effects (Fig. 2c). In this case no statistical difference was observed among the hemoglobin levels of the treated and control groups.

The discrepancy between results of i.p. and *per os* treatments may well be due to the distinct administration models. *Per os* administration comprises a great number of variables, such as rate of dissolution of the compounds and low gastric pH. Since these factors influence the absorption and bioavailability of

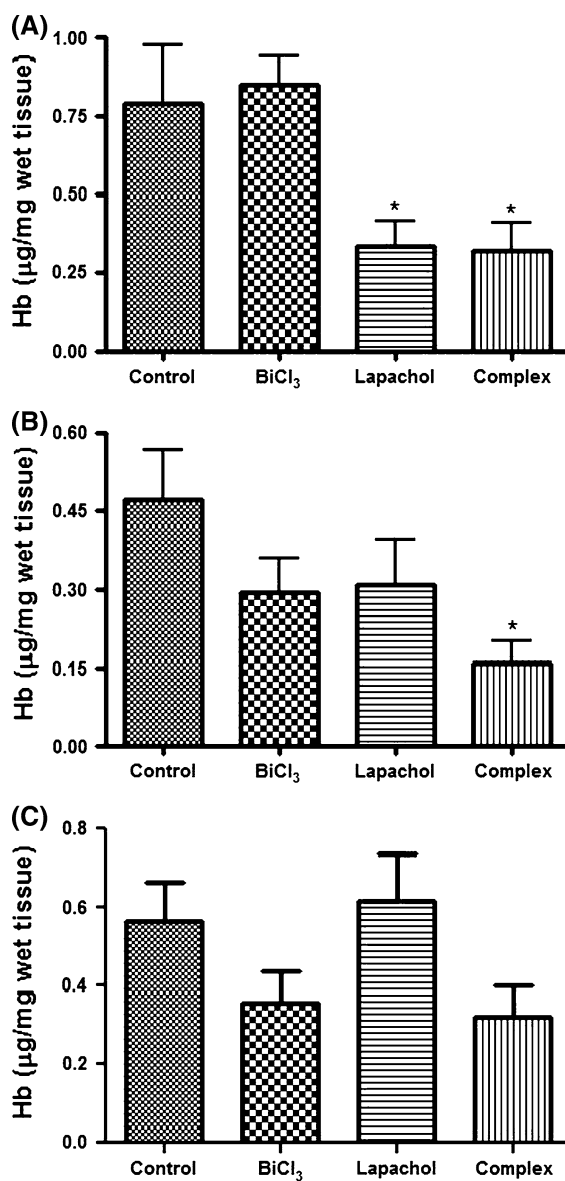


Fig. 2 Effects in the hemoglobin content induced by lapachol, complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ and BiCl_3 on angiogenesis in murine models ($n = 6-8$) for **a** i.p. treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, **b** *per os* treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, and **c** *per os* treatment with lapachol at $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex. *statistically different in comparison to control, $P < 0.05$

the compounds, they may have been responsible for the loss of activity of lapachol. Thus, results suggest that coordination seems to be a good strategy to

improve the anti-angiogenic profile of lapachol in the *per os* treatment.

Measurement of leukocyte accumulation

Inflammatory components of the sponge-induced chronic inflammation were determined by estimating the number of leukocytes in the implant by assaying marker enzyme activities. Macrophage and neutrophils accumulation in the implants were assessed by measuring NAG and MPO activities (Mendes et al. 2009b).

In the *i.p.* treatment, NAG activity was statistically decreased in the treated groups with lapachol and complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$, showing an effect in this inflammatory cell population. After *per os* treatment with lapachol $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$, NAG activity was inhibited relative to the control group only by the bismuth(III) complex. Thus, it is clear that lapachol was not able to interfere with macrophages recruitment after *per os* administration. Interestingly, the obtained results are in agreement with the reduction of neo-vascularization, where coordination to bismuth(III) seemed to improve the activity of lapachol in the *per os* treatment.

In the *per os* treatment with using lapachol $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ no statistical difference was observed between NAG activity in the treated and control groups (Fig. 3).

In both *i.p.* and *per os* treatments, MPO activity in the implants did not decrease suggesting that the studied compounds were unable to reduce neutrophils recruitment/activation in this model of inflammatory angiogenesis.

Gross appearance of implants and histological assessments

No signs of infection or rejection were observed in the implant location or in the incision during the 9-day period of the experiment. Histological analysis (H&E) showed that this procedure induced a fibro-vascular response causing the synthetic sponge matrix to be filled with a newly formed tissue (Fig. 4). The control implants were infiltrated by fibro-vascular stroma occupying the entire sponge by day 9. The tissue was composed of a dense inflammatory infiltrate with various cell types such as

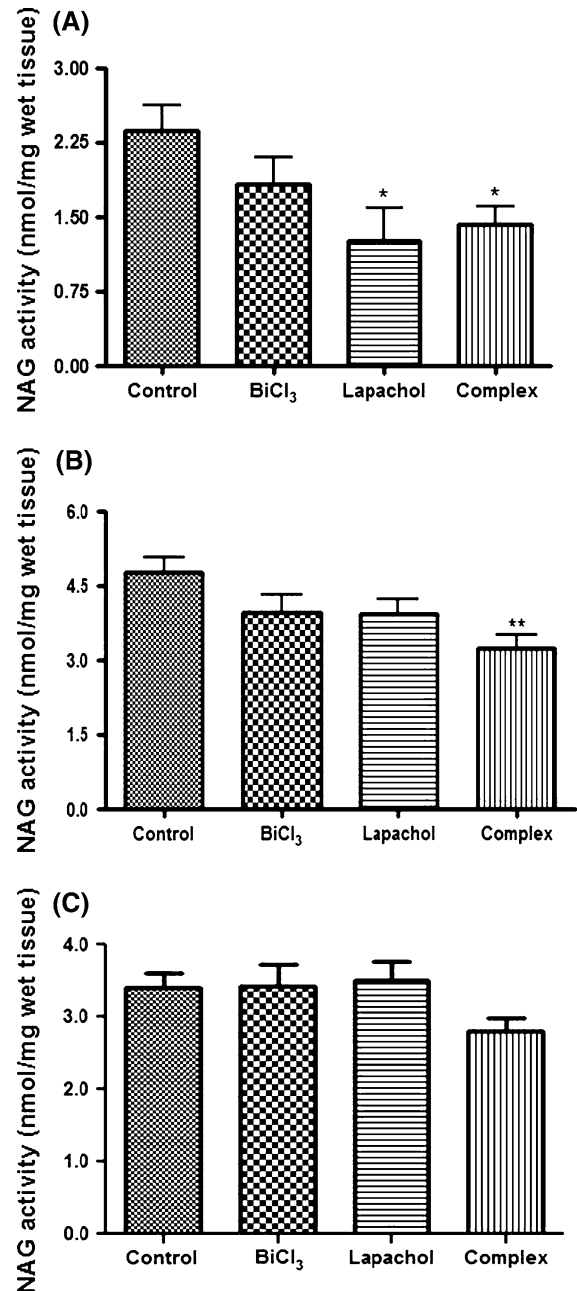


Fig. 3 Effects in the macrophage accumulation induced by lapachol, complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ and BiCl_3 on angiogenesis in murine models ($n = 8\text{--}13$) for **a** *i.p.* treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, **b** *per os* treatment with lapachol at $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex, and **c** *per os* treatment with lapachol at $2.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and equivalent doses of BiCl_3 and bismuth(III) complex. * and **statistically different in comparison to control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

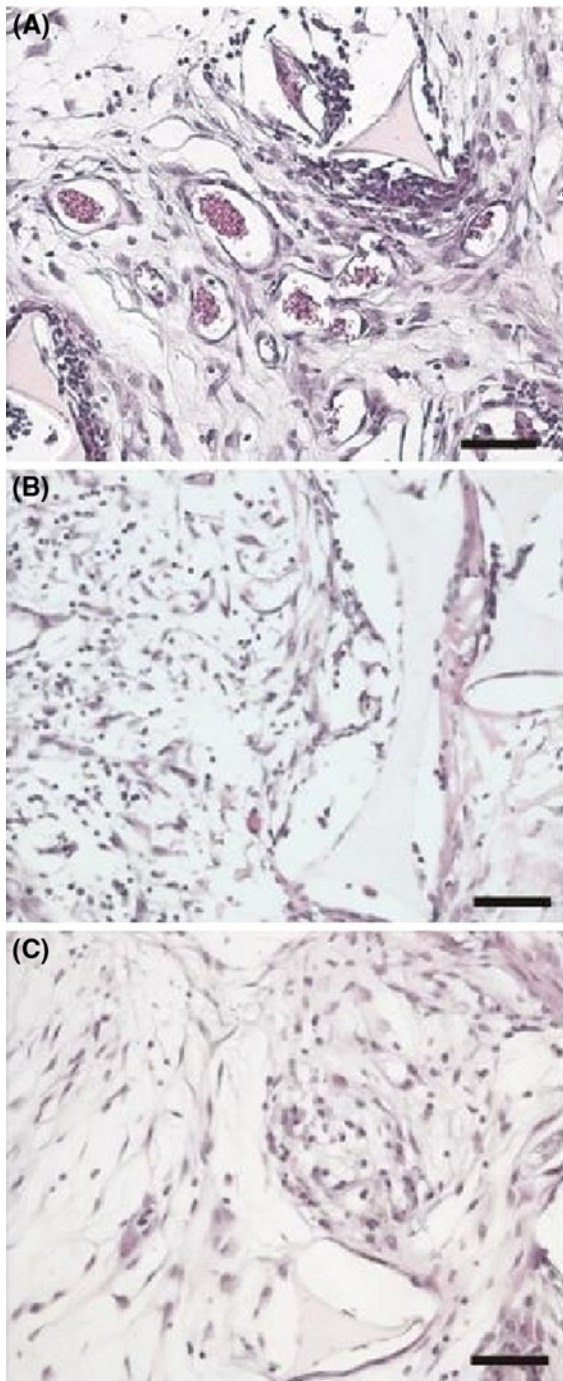


Fig. 4 Representative histological sections (5 μm , stained with H&E) of fibro-vascular tissue induced in subcutaneous sponge implants in Swiss mice at day 9 post implantation. The newly formed tissue in control implants (a) densely vascularized infiltrate with inflammatory cells, spindle-shaped fibroblasts. In lapachol- (b) and complex- (c) treated groups the number of vessels and inflammatory infiltrate are much lesser compared with the control group. Bar: 100 μm

leukocytes and microvessels. In lapachol- and complex-treated groups vascularization and inflammatory cell infiltrate were decreased.

Conclusions

Vascularization and inflammatory cell infiltrate were decreased in lapachol- and complex-treated groups. When i.p. administered lapachol and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ statistically reduced the hemoglobin content in the implants suggesting that reduction of neo-vascularization is caused by free lapachol in both experimental groups. On the other hand, in the *per os* treatment only complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ statistically decreased the hemoglobin content in the implants. Similarly, NAG activity in the implants was statistically decreased by lapachol and $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ in the i.p. treatment, while in the *per os* treatment inhibition was observed only by the bismuth(III) complex. In both i.p. and *per os* treatments, MPO activity, did not decrease in the implants suggesting that the studied compounds are unable to reduce the number of neutrophils in the assayed conditions.

Our results indicate that lapachol and complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ present anti-angiogenic and anti-inflammatory properties on the fibro-vascular tissue induced by the synthetic matrix. The effects of $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ are attributed to the lapachol ligand. However, coordination to bismuth(III) could be an interesting strategy for improvement of lapachol's therapeutic effects. In the employed model, the sponge induces an inflammatory angiogenic response that reproduces many features of the healing occurring after mechanical and natural injuries such as balloon angioplasty, atherosclerosis, inflamed synovium and surgical wounds (Rocha et al. 2006). Hence, lapachol and its bismuth(III) complex $[\text{Bi}(\text{Lp})_2]\text{Cl}$ may present potential as drug candidates to be used to modulate the inflammatory and angiogenic components of a number of pathological conditions.

Acknowledgment This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

References

- Araújo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP (2010) Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β 1. *Biomed Pharmacother* 64:29–34

- Bezerra DP, Alves AP, De Alencar NM, Mesquita RO, Lima MW, Pessoa C, De Moraes MO, Lopes JN, Lopes NP, Costa-Lotufo LV (2008) Antitumor activity of two derivatives from 2-acylamine-1, 4-naphthoquinone in mice bearing S180 tumor. *J Exp Ther Oncol* 7:113–121
- Briand GG, Burford N (1999) Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chem Rev* 99:2601–2657
- Caruso F, Martínez MA, Rossi M, Goldberg A, Villalba EC, Aymonino PJ (2009) Crystal and molecular structure of manganese(II) lapacholate, a novel polymeric species undergoing temperature-reversible metal to ligand electron transfer. *Inorg Chem* 48:3529–3534
- Da Silva Júnior EN, Cavalcanti BC, Guimarães TT, Pinto MCFR, Cabral IO, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, De Moraes MO, De Andrade CKZ, Dos Santos MR, De Simone CA, Goulart MOF, Pinto AV (2011) Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur J Med Chem* 46:399–410
- De Almeida ER, Da Silva Filho AA, Dos Santos ER, Lopes CAC (1990) Antiinflammatory action of lapachol. *J Ethnopharmacol* 29: 239–241 (*AAPS PharmSciTech* 9: 163–168)
- Eyong KO, Kumar PS, Kuete V, Folefoc GN, Nkengfack EA, Baskaran S (2008) Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg Med Chem Lett* 18:5387–5390
- Ferreira VF (1996) Aprendendo sobre os conceitos de ácido e base. *Química Nova na Escola* 4:35–36
- Ferreira MA, Barcelos LS, Campos PP, Vasconcelos AC, Teixeira MM, Andrades SP (2004) Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol* 141:1185–1192
- Gong Y, Koh D-R (2010) Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res* 339:437–448
- Hall DWR (1989) Review of the modes of action of colloidal bismuth subcitrate. *Scand J Gastroenterol* 24:3–6
- Lee SP (1991) The mode of action of colloidal bismuth subcitrate. *Scand J Gastroenterol* 26:1–6
- Lin C-Y, Shen Y-H, Wu S-H, Lin C-H, Hwang S-M, Tsai Y-C (2004) Effect of bismuth subgallate on nitric oxide and prostaglandin E2 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 315:830–835
- Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T (2008) Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicol Appl Pharm* 229:232–238
- Martínez MA, De Jiménez MCL, Castellano EE, Piro OE, Aymonino PJ (2003) Synthesis, structure and properties of a zinc(II) complex with the lapacholate anion and ethanol as ligands. *J Coord Chem* 56:803–816
- Mendes JB, Campos PP, Rocha MA, Andrade SP (2009a) Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci* 84:537–543
- Mendes JB, Rocha MA, Araújo FA, Moura SAL, Ferreira MAND, Andrade SP (2009b) Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvasc Res* 78:265–271
- Nakamoto K (1970) Infrared spectra of inorganic and coordination compounds, 2nd edn. Wiley-Interscience, New York
- Oliveira RAS, Azevedo-Ximenes E, Luzzati R, Garcia RC (2010) The hydroxy-naphthoquinone lapachol arrests mycobacterial growth and immunomodulates host macrophages. *Int Immunopharmacol* 10:1463–1473
- Rocha LTS, Costa KA, Oliveira ACP, Nascimento EB, Bertollo CM, Araújo F, Teixeira LR, Andrade SP, Beraldo H, Coelho MM (2006) Antinociceptive, anti-dematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. *Life Sci* 79:499–505
- Sadler PJ, Li H, Sun H (1999) Coordination chemistry of metals in medicine: Target sites for bismuth. *Coord Chem Rev* 185–186:689–709
- Severi C, Abdullahi M, Tari R, Vannella L, Marcheggiano A, Capoccia D, Leonetti F, Osborn J, Annibale B (2009) High efficacy of bismuth subcitrate for *Helicobacter pylori* eradication in pangastritis. *Digest Liver Dis* 41:555–558
- Walsh DA, Pearson CI (2001) Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res* 3:147–153
- Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, Rocha MA, Campos PR, Cota BDCV, Tafuri LSA, Paiva AMR, Silva JH, Andrade SP, Belo AV (2010) Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother* 64:220–225
- Yang N, Sun H (2007) Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. *Coord Chem Rev* 251:2354–2366

Accepted Manuscript

2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells

Angel A.R. Despaigne, Gabrieli L. Parrilha, Jans B. Izidoro, Pryscila R. da Costa, Raquel G. dos Santos, Oscar E. Piro, Eduardo E. Castellano, Willian R. Rocha, Heloisa Beraldo

PII: S0223-5234(12)00067-0

DOI: [10.1016/j.ejmech.2012.01.051](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.051)

Reference: EJMECH 5350

To appear in: *European Journal of Medicinal Chemistry*

Received Date: 3 October 2011

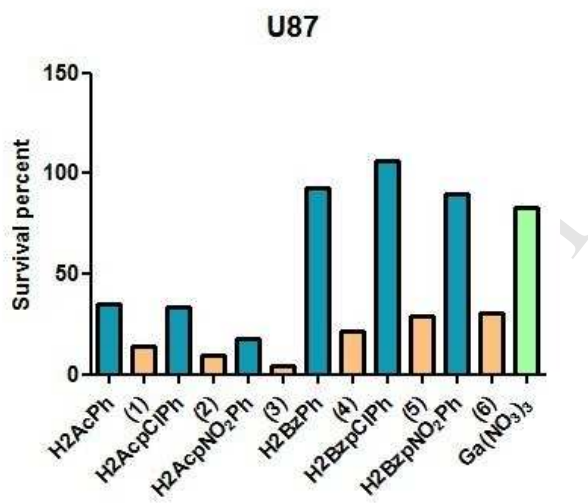
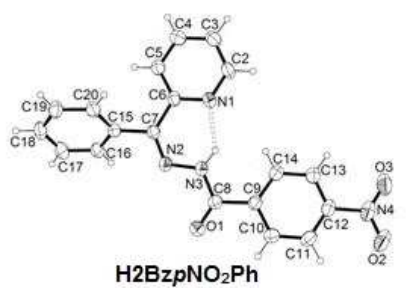
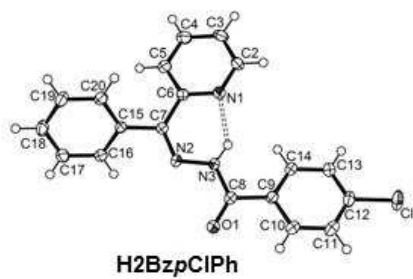
Revised Date: 20 January 2012

Accepted Date: 24 January 2012

Please cite this article as: A.A. Despaigne, G.L. Parrilha, J.B. Izidoro, P.R. da Costa, R.G. dos Santos, O.E. Piro, E.E. Castellano, W.R. Rocha, H. Beraldo, 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2012), doi: 10.1016/j.ejmech.2012.01.051

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.





1 **2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III)**
2 **complexes are highly cytotoxic to glioma cells**

3 Angel A. R. Despaigne^a, Gabrieli L. Parrilha^a, Jans B. Izidoro^b, Priscila R. da Costa^b, Raquel G. dos
4 Santos^b, Oscar E. Piro^c, Eduardo E. Castellano^d, Willian R. Rocha^a, Heloisa Beraldo^{a*}

5
6 ^a *Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG,*
7 *Brazil*

8 ^b *Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil*

9 ^c *Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata and*
10 *Instituto IFLP (CONICET – CCT La Plata), C.C. 67, 1900 La Plata, Argentina*

11 ^d *Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil*

12 * *hberaldo@ufmg.br*

13
14 **Abstract**

15 2-Acetylpyridine-phenylhydrazone (H2AcPh), its *para*-chlorophenylhydrazone (H2AcpClPh)
16 and *para*-nitrophenylhydrazone (H2AcpNO₂Ph) analogues, the corresponding 2-benzoylpyridine-
17 derived hydrazones (H2BzPh, H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph) and their gallium(III) complexes were
18 assayed for their cytotoxic activity against U87 (expressing wild-type p53 protein) and T98
19 (expressing mutant p53 protein) glioma cells. IC₅₀ values against both glioma cells and against the
20 MRC5 (human fetal lung fibroblast) lineage were obtained for the hydrazones, but not for their
21 gallium(III) complexes, due to their low solubility. Hydrazones were highly cytotoxic at nanomolar
22 doses against U87 and T98 cells. The therapeutic indexes (TI = IC_{50MRC5}/IC_{50 glioma}) were 2-660 for T98
23 cells and 28-5000 for U87 cells, indicating that the studied hydrazones could be good antitumor drug
24 candidates to treat brain tumors.

25
26 **Keywords:** Hydrazones; Gallium(III) complexes; Crystal structures; Glioma cells; Cytotoxic activity;
27 SAR studies.

28 1. Introduction

29 Cancer is the leading cause of death in economically developed countries and the second
30 leading cause of death in developing countries [1]. Although brain tumors constitute only 1 to 2 % of
31 the tumors in adults, they have a poor prognosis and the patients' chance of survival is generally very
32 low. Moreover, brain tumors represent one of the most common solid tumor in children, being
33 responsible for 20 % of childhood neoplasms [2,3].

34 Gliomas, especially glioblastomas (GBMs), represent the most malignant primary brain tumor.
35 GBMs have a high rate of cellular proliferation and a marked propensity to infiltrate diffusely into
36 normal brain regions rendering impossible total surgical extirpation and difficult effective local
37 radiotherapy. Such aggressive and invasive growth is the main characteristic which results in their
38 high morbidity and mortality, the median survival of a patient with GBMs being 15 months [4,5].

39 Hydrazones and their metal complexes are an important class of compounds which present
40 innumerable pharmacological applications as antimicrobial [6,7], anticonvulsant [8,9], analgesic and
41 anti-inflammatory [10-12], and anticancer [13-15] agents.

42 Gallium, as $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, is the second metal ion, after platinum, to be used in cancer treatment,
43 but its unfavorable pharmacokinetics has prevented its widespread use in systemic chemotherapy of
44 cancer [16]. Hence, coordination of gallium with organic ligands has been recognized as a promising
45 strategy for the design of new antitumor agents with higher bioavailability and hydrolytic stability, and
46 better membrane penetration ability [17,18].

47 Gallium's activity against tumors is thought to be due to its antiproliferative and antimetabolic
48 effects. Once gallium gets into the cell it exerts its anti-proliferative effects by inhibiting the catalytic
49 activity of ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), a key enzyme in DNA biosyntheses, which is
50 involved in the conversion of ribonucleotides into deoxyribonucleotides. Due to competitive binding
51 of gallium(III) and iron(III), gallium affects intracellular iron availability, but it also interacts directly
52 with RDR, displacing iron from the enzyme [19-21].

53 In a previous work some of us demonstrated that gallium(III) complexes with
54 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones exhibit potent cytotoxic activity against
55 glioblastoma cells [18]. In the context of a research program that aims to contribute to the discovery of

56 new anticancer drug candidates with activity against gliomas, in the present work 2-acetylpyridine-
57 phenylhydrazone (H2AcPh), its *para*-chlorophenylhydrazone (H2AcpClPh) and *para*-
58 nitrophenylhydrazone (H2AcpNO₂Ph) analogues, the corresponding 2-benzoylpyridine-derived
59 hydrazones (H2BzPh, H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph) and their gallium(III) complexes were assayed
60 for their cytotoxic activity against malignant glioma cells.

61 It is well known that glioma cells express wild-type pro-apoptotic p53 protein [22]. Two
62 glioma cell lines were used in the present investigation: U87 cells, which express wild-type p53 and
63 T98 cells, expressing mutant p53. Previous characterization of p53 genotype and drug sensitivity of
64 human cancer cell lines has revealed that cells with mutant or absent p53 are less sensitive than cells
65 with wild-type p53 to the majority of clinically used anticancer agents [22].

66 Structure-activity relationships (SAR) studies were carried out.

67 **Insert Figure 1**

69 **2. Results and Discussion**

70 *2.1 Formation of the gallium(III) complexes*

71 Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of
72 [Ga(2AcPh)₂]₂NO₃·H₂O (**1**), [Ga(2AcpClPh)₂]₂NO₃·H₂O (**2**), [Ga(2AcpNO₂)₂]₂NO₃·1.5H₂O (**3**),
73 [Ga(2BzPh)₂]₂NO₃·2H₂O (**4**), [Ga(2BzpClPh)₂]₂NO₃·2H₂O (**5**) and [Ga(2BzpNO₂Ph)₂]₂NO₃·H₂O (**6**), in
74 which two anionic hydrazones are attached to the metal center. The presence of crystallization water
75 molecules in complexes (**1-6**) was confirmed by their thermogravimetric curves.

77 *2.2 Spectroscopic characterization*

78 The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{N})$ at 1603-1576 cm⁻¹ in the infrared spectra of the free
79 hydrazones shift to 1603-1597 cm⁻¹ in the spectra of the complexes, in agreement with coordination of
80 the azomethine nitrogen [23-26]. The $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorption at 1687-1654 cm⁻¹ in the spectra of the
81 uncomplexed hydrazones disappear in those of the complexes, indicating coordination of the enolate
82 oxygen. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 654-614 cm⁻¹ in the spectra of the
83 hydrazones shifts to 653-648 cm⁻¹ in the complexes, suggesting coordination of the hetero-aromatic

84 nitrogen [23-25]. In addition, new absorptions at 423-410 cm^{-1} and 235-219 cm^{-1} in the spectra of the
85 complexes were attributed to the $\nu(\text{Ga-N})$ and $\nu(\text{Ga-Npy})$ vibrations, respectively [18,27] and bands in
86 the 327-298 cm^{-1} range were assigned to $\nu(\text{Ga-O})$ [28]. In the spectra of the complexes, broad bands at
87 3409-3420 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{OH}_2)$ vibration, in agreement with the presence of
88 crystallization water. Absorptions attributed to nitrate were observed at 1385-1384 cm^{-1} [28].

89 The NMR spectra of the hydrazones and their gallium(III) complexes were recorded in
90 $\text{DMSO-}d_6$. The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The
91 carbon type (C, CH) was determined by using distortion-less enhancement by polarization transfer
92 (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear
93 multiple quantum coherence experiments (HMQC).

94 In the ^1H NMR spectra of the hydrazones, except for $\text{H}_2\text{AcPNO}_2\text{Ph}$, all signals were
95 duplicated, indicating the presence of the *Z* and *E* configurational isomers in the $\text{DMSO-}d_6$ solution. In
96 the first, N(3)-H is hydrogen bonded to the hetero-aromatic nitrogen (δ 14.72-15.86), while in the
97 second N(3)-H is hydrogen bonded to the solvent (δ 10.15-10.96) [7,23]. In the ^1H NMR spectrum of
98 $\text{H}_2\text{AcPNO}_2\text{Ph}$ only one signal was observed for each hydrogen (N(3)-H at δ 11.22), suggesting the
99 presence of only the *E* isomer [7].

100 In the spectra of the gallium(III) complexes ($\text{DMSO-}d_6$) only one signal was observed for all
101 hydrogens, indicating the presence of only one configuration in solution. The signals of N(3)-H
102 observed in the spectra of free hydrazones were absent in the spectra of complexes (**1-6**), in
103 accordance with the presence of anionic ligands upon deprotonation. In the spectra of the complexes
104 the signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the uncomplexed
105 hydrazones. Similarly, the signals of C=N, C=O and the pyridine carbons undergo significant shifts,
106 indicating coordination through the $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-O}$ chelating system. Hence, in the gallium(III) complexes
107 the hydrazones adopt the *E* configuration.

108

109

110

111 2.3 X-ray crystallography

112 Figure 2 shows ORTEP [29] drawings of H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph, while the ORTEP
 113 drawing of [Ga(2AcPh)₂]⁺ is shown in Figure 3. Crystal data and refinement results are listed in Table
 114 1. The crystal structure of H2AcPh has been previously determined by other authors [30]. Tables 2 and
 115 3 present selected intra-molecular bond distances and angles for H2BzpClPh, H2BzpNO₂Ph, H2AcPh
 116 [30] and complex [Ga(2AcPh)₂]⁺.

117 **Insert Table 1**118 **Insert Figure 2**

119 H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph show similar molecular conformations. The C8=O1 and
 120 C7=N2 distances were 1.215(2) and 1.302(2) Å for H2BzpClPh, and 1.214(2) and 1.297(2) Å for
 121 H2BzpNO₂Ph, as expected for formally double bonds. The N2-N3 length of 1.369(2) Å for both
 122 compounds agrees with the single character of this bond.

123 The molecules' conformation is stabilized by a strong intra-molecular N-H...N bond
 124 [d(N3...N1) = 2.612(2) Å, ∠(N3-H...N1) = 131.6° for H2BzpClPh and d(N3...N1) = 2.613(2) Å,
 125 ∠(N3-H...N1) = 135.3° for H2BzpNO₂Ph]. Subjected to intra-molecular steric hindrance and crystal
 126 packing interactions, this H-bond tends to produce a nearly planar Py-C7=N2-(N3H)-(C8=O1)-
 127 skeleton [*rms* distance of atoms from the least-squares plane of 0.176 Å (Cl) and 0.102 Å (NO₂)].
 128 Interestingly, the conformer obtained by 180° rotation around the C7-N2 bond affords the neutral
 129 molecule or its deprotonated (at N3) anion which act as tridentate ligands of metal ions. In fact, this is
 130 the case of complexes [Zn(H2BzpClPh)Cl₂].H₂O and [Zn(2BzpNO₂Ph)Cl(DMSO)] [23].

131 **Insert Tables 2 and 3**

132 A difference Fourier map phased on the [Ga(2AcPh)₂]⁺ complex (**1a**) showed that the nitrate
 133 counter ion and possible solvent molecules are severely disordered in the lattice. In [Ga(2AcPh)₂]⁺
 134 (**1a**), the Ga(III) ion is in a distorted octahedral environment (GaN₄O₂) coordinated to two nearly
 135 planar (*rms* deviation of atoms from the least-squares plane of 0.017 and 0.035 Å) and mutually
 136 perpendicular (2AcPh)⁻ ligands [angled at 87.61(3)° from each other]. The hydrazones behave as
 137 tridentate N-N-O chelating systems. In **1a** the imine N-atoms are in *trans* position to each other, and

138 the carbonyl oxygen and the pyridine nitrogen are *cis* to each other (see Fig. 4). *Trans* L-Ga-L angles
139 are in the range from 159.9(1) to 170.9(1)° and *cis* L-Ga-L angles from 76.8(1) to 107.92(9)°.

140 **Insert Figure 3**

141 In complex (**1a**) there is a slight shortening of the bond distance between the gallium center
142 and the imine nitrogen, 1.975(2) and 1.988(2) Å, compared to the distance between the metal and the
143 hetero-aromatic nitrogen, 2.139(3) and 2.115(3) Å. The Ga-O distances are 1.956(2) and 1.960(2) Å.

144 The expected lengthening of the C8-O1 bonds from 1.219(2) Å in H2AcPh [30] to 1.295(4)
145 and 1.296(4) Å in **1a**, together with the shortening of the N3-C8 bond from 1.347(3) Å in H2AcPh
146 [30] to 1.321(4) and 1.326(4) Å in **1a** were observed (see Table 2). Therefore, the C8-O1 bond
147 changes from a double to a predominantly single bond whereas N3-C8 acquires some double bond
148 character due to deprotonation at N3 and formation of a highly delocalized system [7,30].

149

150 2.4 Cytotoxic activity

151 The cytotoxic effects of the hydrazones and their gallium(III) complexes were assayed on U87
152 and T98 malignant glioma cells. Negative control was taken as 100 % survival. Figure 4 presents the
153 percentage of cell survival in the presence of the studied compounds at 1 µmol·L⁻¹. The survival of
154 U87 and T98 cells in the presence of 2-acetylpyridine-derived hydrazones was found to be 14.4-35.1
155 %, while the percentage of survival in the presence of 2-benzoylpyridine-derived hydrazones was
156 above 54.8 %. All gallium(III) complexes exerted higher cytotoxic activity than the free hydrazones
157 against U87 cells. In contrast, the cytotoxic effect of the 2-acetylpyridine-derived hydrazones and their
158 gallium(III) complexes against T98 cells was comparable, indicating that coordination did not improve
159 the activity. Coordination to gallium(III) improved the activity of the 2-benzoylpyridine-derived
160 hydrazones against T98 cells. Ga(NO₃)₃ showed no cytotoxic effect against the tested cell lineages.

161 **Insert Figure 4**

162 The obtained preliminary results of cell survival stimulated the determination of the
163 compounds' concentration able to kill 50 % of the glioma cells (IC₅₀). For comparison, IC₅₀ values
164 were also obtained against the MRC5 (Human Fetal Lung Fibroblast) lineage, as a model of healthy

165 cells. Etoposide, an antineoplastic drug in clinical use, was employed as positive control. IC_{50} values
166 of the gallium(III) complexes were not determined due to their low solubility.

167 Table 4 presents IC_{50} values of the 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived
168 hydrazones against U87, T98 and MRC5 cells. All hydrazones, except H2BzpNO₂Ph, were highly
169 active against malignant glioma cells with IC_{50} values between 0.07 and 26.1 nmol·L⁻¹ against U87
170 (p53 wild type) cells and between 0.43 and 415 nmol·L⁻¹ against T98 cells (p53 mutant).

171 2-Acetylpyridine-derived hydrazones were more active than the 2-benzoylpyridine analogues
172 against both cell lineages. H2AcpClPh proved to be the most cytotoxic compound against U87 cells
173 while H2AcpNO₂Ph was the most cytotoxic compound against T98 cells. All hydrazones except
174 H2BzpNO₂Ph, were more potent than the reference drug etoposide.

175 Interestingly, the IC_{50} values against MRC5 cells, which act as a model of healthy cells, were
176 much higher. In fact, the therapeutic indexes ($TI = IC_{50MRC5}/IC_{50\text{ glioma}}$) were 2-660 for T98 cells and
177 28-5000 for U87 cells, indicating that the studied hydrazones could be good antitumor drug candidates
178 to treat brain tumors.

179 **Insert Table 4**

181 *2.5 Induction of membrane DNA changes characteristics of apoptosis*

182 Under inverted microscope, cell shape and its changes can be clearly observed. A wide range
183 of phenotypic modifications, with a clear concentration-response tendency was observed in both
184 glioma cell lines but not in MRC5 cells after exposure to all tested compounds. As shown in Figure 5,
185 cells in the control groups present cytoplasmatic expansions, and treatment with all compounds caused
186 retraction of cytoplasmatic expansions, leading to round shaped cells, cell shrinkage and blebs
187 formation in both p53 wild-type and mutant cell lines. Reduction of the number of cells after treatment
188 was also observed. T98 cells seem to be slightly more resistant than U87 cells. In fact T98 cells
189 presented such alterations at higher concentrations of H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph. All of the
190 observed morphological changes are associated with programmed cell death (apoptosis).

191 **Insert Figure 5**

245 Hydrazones derived from pyridoxal and from salicylaldehyde were shown to be good iron
246 chelators and to present antiproliferative effect against tumor cell lines. [31]. Iron is essential for the
247 function of many key proteins such as RDR, being vital for cellular replication. Interestingly, addition
248 of a saturating amount of iron to hydrazone chelators prevented their antiproliferative effects,
249 suggesting that these ligands disrupt normal cellular iron metabolism [31]. It has also been shown that
250 gallium potentiates the antiproliferative effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone [31].

251 The studied hydrazones are good chelators of both gallium and iron [32]. In addition
252 coordination to gallium(III) resulted in increased cytotoxic activity, indicating that the mode of action
253 of the studied compounds could involve disruption of iron metabolism.

254

255 **4. Materials and Methods**

256 *4.1 Chemistry*

257 *4.1.1 Synthesis of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones*

258 2-Acetylpyridine-phenylhydrazone, its *para*-chlorophenylhydrazone and *para*-
259 nitrophenylhydrazone analogues and the corresponding 2-benzoylpyridine-derived hydrazones were
260 prepared previously by some of us [7,23] and by other authors [33,34]. Their syntheses were carried
261 out as described before [7,23,33,34]. Crystals of H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph suitable for X-ray
262 diffraction were obtained by slow evaporation from an ethanol solution.

263

264 *4.1.2 Synthesis of the gallium(III) complexes*

265 The gallium(III) complexes were obtained by stirring under reflux an ethanol solution of the
266 desired hydrazone with gallium nitrate in 2:1 ligand-to-metal molar ratio for seven hours (see Scheme
267 1). The obtained solids were washed with ethanol, diethylether and then dried *in vacuo*.

268

Insert Scheme 1

269 Upon recrystallization of [Ga(2AcPh)₂]NO₃·H₂O (**1**) in ethanol, single crystals containing the
270 complex [Ga(2AcPh)₂]⁺ (**1a**) suitable for structural X-ray diffraction were obtained.

271

272 *Bis*(2-acetylpyridinephenylhydrazonato)gallium(III) nitrate monohydrate [Ga(2AcPh)₂]NO₃·H₂O (**1**)

273 Yellow solid. Anal. Calc. for $C_{28}H_{26}GaN_7O_6$ (FW = 626.27 g.mol⁻¹): C, 53.70 %; H, 4.18 %;
 274 N, 15.66 %. Found: C, 53.43 %; H, 4.21 %; N, 15.66 %. Thermogravimetry (30-100 °C range): Calc.
 275 weight loss of one water molecule: 2.87 %. Found: 2.53 %. Molar conductivity (1×10^{-3} mol.L⁻¹
 276 DMF): 73.30 $\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=N)$ 1602, $\rho(py)$ 648, $\nu(NO_3)$ 1384. IR (CsI/nujol, cm⁻¹):
 277 $\nu(M-N)$ 442, $\nu(M-O)$ 327, $\nu(M-Npy)$ 246, 235. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆)
 278 [δ (ppm), *J* (Hz)]: 8.48 (d, 1H, H6), 7.74; 8.42 (t, 1H, H5), 7.80; 8.23 (d, 1H, H3), 5.06; 7.76 (t, 1H,
 279 H4), 6.36; 3.06 (s, 3H, H15). The main signals in ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.9 (C8), 154.4
 280 (C2), 146.2 (C6), 145.5 (C7), 143.8 (C4), 128.2 (C5), 125.6 (C3), 13.7 (C15). Yield 59 %.

281

282 *Bis*(2-acetylpyridine-*para*-chloro-phenylhydrazonato)gallium(III) nitrate monohydrate
 283 [Ga(2AcpClPh)₂]NO₃·H₂O (2)

284 Yellow solid. Anal. Calc. for $C_{28}H_{24}Cl_2GaN_7O_6$ (FW = 695.16 g.mol⁻¹): C, 48.38 %; H, 3.48
 285 %; N, 14.10 %. Found: C, 48.15 %; H, 3.61 %; N, 14.14 %. Thermogravimetry (30-100 °C range):
 286 Calc. weight loss of one water molecule: 2.59 %. Found: 2.41 %. Molar conductivity (1×10^{-3} mol.L⁻¹
 287 DMF): 82.98 $\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=N)$ 1600, $\rho(py)$ 648, $\nu(NO_3)$ 1384. IR (CsI/nujol, cm⁻¹):
 288 $\nu(M-N)$ 420, $\nu(M-O)$ 317, $\nu(M-Npy)$ 219. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆) [δ (ppm), *J*
 289 (Hz)]: 8.47 (d, 1H, H6), 7.89; 8.40 (t, 1H, H5), 7.78; 8.22 (d, 1H, H3), 4.76; 7.76 (t, 1H, H4), 6.38;
 290 3.04 (s, 3H, H15). The main signals in ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.9 (C8), 155.0 (C2), 146.3
 291 (C6), 145.4 (C7), 143.9 (C4), 128.9 (C5), 125.7 (C3), 13.7 (C15). Yield 66 %.

292

293 *Bis*(2-acetylpyridine-*para*-nitro-phenylhydrazonato)gallium(III) nitrate sesquihydrate
 294 [Ga(2AcpNO₂Ph)₂]NO₃·1.5H₂O (3)

295 Yellow solid. Anal. Calc. for $C_{28}H_{24}GaN_9O_{10}$ (FW = 725.27 g.mol⁻¹): C, 46.95 %; H, 3.38 %;
 296 N, 17.60 %. Found: C, 46.37 %; H, 3.47 %; N, 17.38 %. Thermogravimetry (30-100 °C range): Calc.
 297 weight loss of 1.5 water molecule: 3.72 %. Found: 3.58 %. Molar conductivity (1×10^{-3} mol.L⁻¹
 298 DMF): 71.54 $\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=N)$ 1603, $\rho(py)$ 649, $\nu(NO_3)$ 1384. IR (CsI/nujol, cm⁻¹):
 299 $\nu(M-N)$ 410, $\nu(M-O)$ 317, $\nu(M-Npy)$ 227, 221. The main signals in ¹H NMR (DMSO-*d*₆)

300 [δ (ppm), J (Hz)]: 8.55 (d, 1H, H6), 7.94; 8.46 (t, 1H, H5), 7.83; 8.34-8.28 (m, H, H3); 7.82 (t, 1H,
 301 H4), 5.35; 3.11 (s, 3H, H15). The main signals in ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 171.1 (C8), 156.9
 302 (C2), 146.5 (C6), 145.2 (C7), 144.0 (C4), 129.2 (C5), 123.7 (C3), 14.0 (C15). Yield 68 %.

303

304 *Bis*(2-benzoylpyridinephenylhydrazonato)gallium(III) nitrate dihydrate [Ga(2BzPh) $_2$]NO $_3$ ·2H $_2$ O (**4**)

305 Yellow solid. Anal. Calc. for C $_{38}$ H $_{32}$ GaN $_7$ O $_7$ (FW = 768.43 g.mol $^{-1}$): C, 59.39 %; H, 4.20 %;
 306 N, 12.76 %. Found: C, 58.99 %; H, 4.22 %; N, 12.87 %. Thermogravimetry (30-100 °C range): Calc.
 307 for weight loss of two water molecules: 4.69 %. Found: 4.52 %. Molar conductivity (1 x 10 $^{-3}$ mol·L $^{-1}$
 308 DMF): 71.07 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$. IR (KBr, cm $^{-1}$): ν (C=N) 1600, ρ (py) 649, ν (NO $_3$) 1384. IR (CsI/nujol, cm $^{-1}$)
 309 ν (M-N) 423, ν (M-O) 326, ν (M-Npy) 235. The main signals in ^1H NMR (DMSO- d_6) [δ (ppm), J
 310 (Hz)]: 8.41 (d, 1H, H6), 5.14; 8.36 (t, 1H, H5), 7.89; 8.01-7.99 (m, 1H, H3); 7.85(m, 1H, H4). The
 311 main signals in ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 174.2 (C8), 151.2 (C2), 146.9 (C6), 145.2 (C7),
 312 143.9 (C4), 130.8 (C5), 126.8 (C3). Yield 42 %.

313

314 *Bis*(2-benzoylpyridine-*para*-chloro-phenylhydrazonato)gallium(III) nitrate dihydrate
 315 [Ga(2BzpClPh) $_2$]NO $_3$ ·2H $_2$ O (**5**)

316 Yellow solid. Anal. Calc. for C $_{38}$ H $_{30}$ Cl $_2$ GaN $_7$ O $_7$ (FW = 837.32 g.mol $^{-1}$): C, 54.51 %; H, 3.61
 317 %; N, 11.71 %. Found: C, 54.21 %; H, 3.59 %; N, 11.80 %. Thermogravimetry (30-100 °C range):
 318 Calc. weight loss of two water molecules: 4.30 %. Found: 4.08 %. Molar conductivity (1 x 10 $^{-3}$ mol·L $^{-1}$
 319 1 DMF): 83.86 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$. IR (KBr, cm $^{-1}$): ν (C=N) 1597, ρ (py) 650, ν (NO $_3$) 1385. IR (CsI/nujol,
 320 cm $^{-1}$): ν (M-N) 422, ν (M-O) 298, ν (M-Npy) 234. The main signals in ^1H NMR (DMSO- d_6) [δ (ppm),
 321 J (Hz)]: 8.39 (d, 1H, H6), 5.05; 8.34 (t, 1H, H5), 7.88; 7.99-7.95 (m, 1H, H3); 7.83(m, 1H, H4). The
 322 main signals in ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 173.3 (C8), 151.9 (C2), 147.1 (C6), 145.2 (C7),
 323 144.1 (C4), 130.1 (C5), 127.5 (C3). Yield 52 %.

324

325 *Bis*(2-benzoylpyridine-*para*-nitro-phenylhydrazonato)gallium(III) nitrate monohydrate
 326 [Ga(2BzpNO $_2$ Ph) $_2$]NO $_3$ ·H $_2$ O (**6**)

327 Yellow solid. Anal. Calc. for $C_{38}H_{28}GaN_9O_{10}$ (FW = 840.41 $g \cdot mol^{-1}$): C, 54.31 %; H, 3.36 %;
328 N, 15.00 %. Found: C, 55.06 %; H, 3.78 %; N, 14.93 %. Thermogravimetry (30-100 °C range): Calc.
329 weight loss of one water molecule: 2.14 %. Found: 2.08 %. Molar conductivity ($1 \times 10^{-3} mol \cdot L^{-1}$
330 DMF): $77.31 \Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(C=N)$ 1603, $\rho(py)$ 653, $\nu(NO_3)$ 1385. IR (CsI/nujol, cm^{-1})
331 $\nu(M-N)$ 410, $\nu(M-O)$ 317, $\nu(M-Npy)$ 227. The main signals in 1H NMR (DMSO- d_6) [δ (ppm), J
332 (Hz)]: 8.49 (d, 1H, H6), 5.11; 8.40 (t, 1H, H5), 7.88; 8.06 (d, 1H, H3), 7.97; 7.90 (m, 1H, H4). The
333 main signals in ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 172.9 (C8), 154.0 (C2), 147.8 (C6), 145.4 (C7),
334 144.6 (C4), 131.4 (C5), 129.2 (C3), 13.87 (C15). Yield 73 %.

335

336 4.2 Physical measurements

337 All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.
338 Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Thermogravimetric
339 curves were obtained with a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25-750 °C temperature range,
340 under dynamic nitrogen atmosphere and at a heating rate of 10 °C \cdot min $^{-1}$. An YSI model 31
341 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were
342 recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000-400 cm^{-1}) and
343 nujol mulls between CsI plates (400-200 cm^{-1}). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200
344 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO- d_6 as the solvent and TMS as internal reference.

345

346 4.3 X-ray crystallography

347 Single crystal X-ray diffraction measurements for H2BzpCIPh, H2BzpNO $_2$ Ph and
348 $[Ga(2AcPh)_2]^+$ were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD diffractometer with graphite-
349 monochromated MoK α ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$) radiation. Diffraction data were collected (φ and ω scans with
350 κ -offsets) with COLLECT [35]. Integration and scaling of the reflections were performed with HKL
351 DENZO-SCALEPACK [36] suite of programs. The unit cell parameters were obtained by least-
352 squares refinement based on the angular settings for all collected reflections using HKL SCALEPACK
353 [36]. Data were corrected numerically for absorption with PLATON [37]. The structures were solved

354 by direct and Fourier methods with SHELXS-97 [38] and the corresponding molecular models refined
355 by full-matrix least-squares procedure on F^2 with SHELXL-97 [39]. The hydrogen atoms were
356 included in the molecular models at stereo-chemical positions and refined with the riding method. The
357 methyl H-atoms positions of the 2AcPh ligands in the $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ complex were optimized by
358 treating them as a rigid group which was allowed to rotate around the corresponding C-C bond. A
359 difference Fourier map phased on the $[\text{Ga}(\text{2AcPh})_2]^+$ complex showed that the nitrate counter ion and
360 possible solvent molecules are severely disordered in the lattice. This disorder could not be modeled
361 adequately in terms of the expected molecules. Therefore, we proceeded with the refinement of the
362 ordered Ga(III) complex resorting to a procedure described in [40] and implemented in the program
363 SQUEEZE included in the PLATON [37] suite of programs.

364

365 *4.4 Cells lines and culture conditions*

366 Malignant human cell lines U87 (multiform glioblastoma wild-type), T98 (multiform
367 glioblastoma P53 mutant) and MRC5 (Human Fetal Lung Fibroblast) cells were obtained from the
368 American Type Culture Collection (ATCC, USA). Cell lines were grown as monolayer in Dulbecco's
369 Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab)
370 and antibiotics (50 U/mL penicillin/50 μ M streptomycin), in a humidified atmosphere air/CO₂
371 (5%/95%) at 37°C. Cells 80% confluent were used in all experiments.

372

373 *4.5 Cytotoxic activity*

374 Cytotoxicity was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium
375 bromide (MTT) assay which measures the cellular metabolic viability [41]. The cells were cultured in
376 96-well plates and, 12 hours after incubation, they were treated with different concentrations of test
377 compounds (1×10^{-12} - 1×10^{-5} mol·L⁻¹). Another group of cells was treated with the same
378 concentrations of etoposide (positive control), an antineoplastic drug that inhibits the enzyme
379 topoisomerase II. Compounds were previously dissolved in DMSO and the final concentrations were
380 adjusted, through an 8-fold serial dilution, in DMEM in such manner that final DMSO concentration
381 was lower than 0.5%.

382 After 48h-treatment, the cells were incubated with MTT ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), and formazan crystals
383 were solubilised in DMSO. Absorbance was measured in a microplate reader at 570 nm. Tests using
384 DMSO (0.5% in DMEM) as negative control were carried out in parallel. IC_{50} values were calculated
385 as the concentration of compound that induced 50 % of cytotoxicity.

386

387 *4.6 Morphological analysis of tumor cells*

388 Cells were seeded in 96-well plates and treated with test compounds. For phase contrast
389 microscopy, representative fields of cells were photographed using a TS100 (Nikon) microscope.
390 Morphological changes were analyzed 48 h after the treatment.

391 DNA alterations were detected by 4',6-diamidine-2-phenylindole (DAPI) staining. After the 48
392 hours-treatment with $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of test compounds, cells were washed with PBS and fixed with 70%
393 methanol at room temperature for 30 minutes. Cells were incubated with $0.4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DAPI (Sigma)
394 for 1 h in the dark after washing with PBS. DNA alterations such as fragmentation and chromatin
395 condensation were observed by fluorescence microscopy (Nikon 385-410 nm).

396

397 *4.7 SAR Studies*

398 Conformational analysis of hydrazones was performed using the Merck Molecular Force Field
399 (MMFF) [42] implemented in the Tinker Molecular Modeling Program [43]. For all compounds the *E*
400 and *Z* isomers were analyzed. The minimum energy structures of the isomers of the compounds
401 obtained in the conformational analysis step were further optimized at the Density Functional Theory
402 level [44], employing the hybrid B3LYP [45,46] exchange-correlation functional and using the 6-
403 31G(d) all electron basis set [47,48] for all atoms. In order to have better properties and energetic
404 results, single point energy calculations at the second order Møller-Plesset perturbation theory level
405 [49,50] were then performed on the optimized B3LYP/6-31G(d) structures, using the same basis set
406 (MP2/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d)). The charge distribution on the most stable conformers was
407 computed using the Natural Bonding Orbital (NBO) formalism [51,52]. All quantum mechanical
408 calculations were performed using the Gaussian program [53]. HOMO and LUMO energies, and
409 dipole moments, were obtained after full optimization and were used as descriptors for further SAR

410 studies. The three-dimensional structures obtained from optimization of hydrazones were used as input
411 for the Marvin software [54] to calculate the superficial molecular areas. Theoretical octanol-water
412 partition coefficients (logP) of the hydrazones were performed using ALOGPS 2.1 software, accessed
413 via the Virtual Computational Chemistry Laboratory interface [55]. Superficial molecular area and
414 logP were also used as descriptors for SAR studies.

415

416 **Supplementary material**

417 CCDC 845604, 845605 and 845606 contain supplementary crystallographic data for
418 H2BzpClPh, H2BzpNO₂Ph, and complex [Ga(2AcPh)₂]⁺. These data can be obtained free of charge
419 via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data
420 Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail:
421 deposit@ccdc.cam.ac.uk.

422

423 **Acknowledgments**

424 The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6), INCT-CATÁLISE,
425 FAPEMIG, CNEN, FAPESP (Brazil) and to CONICET (Argentina) for financial support. O. E. P. is a
426 research fellow of CONICET, Argentina.

427

428 **References**

- 429 [1] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, CA
430 Cancer J. Clin. 61 (2011) 69-90.
- 431 [2] M.A. Soares, P.B. Pujatti, C.L. Fortes-Dias, L. Antonelli, R.G. Santos, *Crotalus durissus terrificus*
432 venom as a source of antitumoral agents, J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis. 16 (2010) 480-492.
- 433 [3] C.A. Perez, L.W. Brady, Principles and practice of radiation oncology, Lippincott-Raven
434 Publisher, Philadelphia, 1997.
- 435 [4] E. Nuti, F. Casalini, S. Santamaria, P. Gabelloni, S. Bendinelli, E. Da Pozzo, B. Costa, L.
436 Marinelli, V. La Pietra, E. Novellino, M.M. Bernardo, R. Fridman, F. Da Settimo, C. Martini, A.
437 Rossello, Synthesis and biological evaluation in U87MG glioma cells of (ethylnylthiophene)

- 438 sulfonamido-based hydroxamates as matrix metalloproteinase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 46
439 (2011) 2617-2629.
- 440 [5] M. Tabuse, S. Ohta, Y. Ohashi, R. Fukaya, A. Misawa, K. Yoshida, T. Kawase, H. Saya, C.
441 Thirant, H. Chneiweiss, Y. Matsuzaki, H. Okano, Y. Kawakami, M. Toda, Functional analysis of
442 *HOXD9* in human gliomas and glioma cancer stem cells, *Mol. Cancer* 10 (2011) 1-14.
- 443 [6] P. Vicini, F. Zani, P. Cozzini, I. Doytchinova, Hydrazones of 1,2-benzisothiazole hydrazides:
444 synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 553-564.
- 445 [7] A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo,
446 Organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: antimicrobial activity, *J. Braz.*
447 *Chem. Soc.* 21 (2010) 1247-1257.
- 448 [8] J. Jain, Y. Kumar, R. Sinha, R. Kumar, J. Stables, Menthone aryl acid hydrazones: a new class of
449 anticonvulsants, *Med. Chem.* 7 (2011) 56-61.
- 450 [9] S.K. Sridhar, S.N. Pandeya, J.P. Stables, A. Ramesh, Anticonvulsant activity of hydrazones, Schiff
451 and Mannich bases of isatin derivatives, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 129-132.
- 452 [10] C.M. Moldovan, O. Oniga, A. Pârnu, B. Tipericiuc, P. Verite, A. Pîrnău, O. Crișan, M. Bojișă, R.
453 Pop, Synthesis and anti-inflammatory evaluation of some new acyl-hydrazones bearing 2-aryl-
454 thiazole, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 526-534.
- 455 [11] A.A.M. Eissa, N.A.H. Farag, G.A.H. Soliman, Synthesis, biological evaluation and docking
456 studies of novel benzopyranone congeners for their expected activity as anti-inflammatory, analgesic
457 and antipyretic agents, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 5059-5070.
- 458 [12] R.S. Hoonur, B. R. Patil, D.S. Badiger, R.S. Vadavi, K.B. Gudasi, P.R. Dandawate, M.M.
459 Ghaisas, S.B. Padhye, M. Nethaji, Transition metal complexes of 3-aryl-2-substituted 1,2-
460 dihydroquinazolin-4(3H)-one derivatives: new class of analgesic and anti-inflammatory agents, *Eur. J.*
461 *Med. Chem.* 45 (2010) 2277-2282.
- 462 [13] D.B. Lovejoy, D.R. Richardson, Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and
463 thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells, *Blood* 100
464 (2002) 666-676.
- 465 [14] D.R. Richardson, E.H. Tran, P. Ponka, The potential of iron chelators of the pyridoxal

- 466 isonicotinoyl hydrazone class as a effective antiproliferative agents, *Blood* 86 (1995) 4295-4306.
- 467 [15] L. Savini, L. Chiasserini, V. Travagli, C. Pellerano, E. Novellino, S. Cosentino, M.B. Pisano,
468 New α -(*N*)-heterocyclichydrazones: evaluation of anticancer, anti_HIV and antimicrobial activity,
469 *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 113-122.
- 470 [16] P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Gallium in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol.*
471 *Hemat.* 42 (2002) 283-296.
- 472 [17] A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M.A. Jakupec, V.B. Arion, A.R. Timerbaev,
473 B.K. Keppler, Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: solubility, stability,
474 lipophilicity and binding to serum proteins, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1819-1826.
- 475 [18] I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Gallium(III) complexes of
476 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma, *Eur. J.*
477 *Med. Chem.* 44 (2009) 1870-1877.
- 478 [19] C.R. Kowol, R. Berger, R. Eichinger, A. Roller, M.A. Jakupec, P.P. Schmidt, V.B. Arion, B.K.
479 Keppler, Gallium(III) and iron(III) complexes of α -*N*-heterocyclic thiosemicarbazones: synthesis,
480 characterization, cytotoxicity, and interaction with ribonucleotide reductase, *J. Med. Chem.* 50 (2007)
481 1254-1265.
- 482 [20] V.B. Arion, M.A. Jakupec, M. Galanski, P. Unfried, B.K. Keppler, Synthesis, structure,
483 spectroscopic and in vitro antitumour studies of a novel gallium(III) complex with 2-acetylpyridine, *J.*
484 *Inorg. Biochem.* 91 (2002) 298-305.
- 485 [21] C.R. Chitambar, Gallium nitrate for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, *Expert Opin.*
486 *Investig. Drugs* 13 (2004) 531-541.
- 487 [22] P.M. O'Connor, J. Jackman, I. Bae, T.G. Myers, S. Fan, M. Mutoh, D.A. Scudiero, A. Monks,
488 E.A. Sausville, J.N. Weinstein, S. Friend, A.J. Fornace Jr., K.W. Kohn, Characterization of the p53
489 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and
490 correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res.* 57 (1997) 4285-
491 4300.
- 492 [23] A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo,
493 Structural studies on zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-derived hydrazones, *Inorg. Chim.*

- 494 Acta 362 (2009) 2117-2122.
- 495 [24] A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo,
496 Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-methyl hydrazone, J. Mol. Struct. 920
497 (2009) 97-102.
- 498 [25] A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H.
499 Beraldo, Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-formylpyridine-derived hydrazones, Polyhedron 28
500 (2009) 3797-3803.
- 501 [26] G.L. Parrilha, R.P. Vieira, A.P. Rebolledo, I.C. Mendes, L.M. Lima, E.J. Barreiro, O.E. Piro, E.E.
502 Castellano, H. Beraldo, Binuclear zinc(II) complexes with the anti-inflammatory compounds
503 salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde-4-cholobenzoyl hydrazone (H₂LASSBio-1064),
504 Polyhedron 30 (2011) 1891-1898.
- 505 [27] J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Increasing the
506 antibacterial activity of gallium(III) against *Pseudomonas aeruginosa* upon coordination to pyridine-
507 derived thiosemicarbazones, Polyhedron 28 (2009) 2301-2305.
- 508 [28] K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, second ed., Willey-
509 Interscience, New York, 1970.
- 510 [29] C.K. Johnson, *ORTEP-II. Report ORNL-5318*, Oak Ridge National Laboratory, TN, USA, 1976.
- 511 [30] J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D.N. Deobagkar, C.E. Anson, A. Powell, Structural chemistry
512 and in vitro antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against
513 *Mycobacterium smegmatis*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 51-55.
- 514 [31] D.R. Richardson, E.H. Tran, P. Ponka, The potential of iron chelators of the pyridoxal
515 isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, Blood 86 (1995) 4295-4306.
- 516 [32] P.V. Bernhardt, G.J. Wilson, P.C. Sharpe, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Tuning the
517 antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination
518 chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands, J.
519 Biol. Inorg. Chem. 13 (2008) 107-119.
- 520 [33] T.E. Khalil, L. Labib, M.F. Iskander, L.S. Reffat, Organotin(IV) complex with tridentate ligands.
521 II. Synthesis and characterization of monomethyltin(IV) and dimethyltin(IV) complexes with *N*-(2-

- 522 pyridinylmethylene)benzoylhydrazine. The crystal and molecular-structure of monomethyldichloro
523 [*N*-(2-pyridinylmethylene)benzoylhydrazinate NNO(-1)]tin(IV), *Polyhedron* 13 (1994) 2569-2578.
- 524 [34] S. Choudhary, J.R. Morrow, Dynamic acylhydrazone metal ion complex libraries: a mixed-ligand
525 approach to increased selectivity in extraction, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4096-4098.
- 526 [35] Enraf-Nonius (1997-2000). COLLECT. Nonius BV, Delft, The Netherlands.
- 527 [36] Z. Otwinowski, W. Minor, In *Methods in Enzymology*, 276, edited by C.W. Carter, Jr., R.M.
528 Sweet pp. 307-326, New York: Academic Press, 1997.
- 529 [37] A.L. Spek, PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The
530 Netherlands, 1998.
- 531 [38] G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution. University of Göttingen:
532 Göttingen, Germany 1997. See also: G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 46 (1990) 467-473.
- 533 [39] G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis. University of Göttingen:
534 Göttingen, Germany 1997. See also: G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112-122.
- 535 [40] P. Van der Sluis, A.L. Spek, *Acta Crystallogr., Sect A* 46 (1999) 194-201.
- 536 [41] J.A. Plumb, R. Miloroy, S.B. Kaye, Effects of the pH of 3-[4,5-dimethyliazol-2-yl]-2,5-difenil-
537 tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based
538 assay, *Cancer Res.* 49 (1989) 4435-4440.
- 539 [42] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, AM1: A new general purpose quantum
540 mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902-3909.
- 541 [43] TINKER Software Tools for Molecular Design, 5.0, 2009: TINKER Software Tools for
542 Molecular Design, 5.0; Jay W. Ponder Lab, Dept. of Biochemistry & Molecular Biophysics,
543 Washington University School of Medicine: St. Louis, 2009.
- 544 [44] R.G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University
545 Press, Oxford, 1989.
- 546 [45] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.*
547 98 (1993) 5648-5652.

- 548 [46] C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, Development of the colle-salvetti correlation-energy formula
549 into a functional of the electron-density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785-789.
- 550 [47] R. Ditchfield, W.J. Hehre, J.A. Pople, Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended
551 Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules, *J. Chem. Phys.* 54 (1971) 724-
552 728.
- 553 [48] W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, Self-consistent molecular-orbital methods. XII. Further
554 extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules, *J.*
555 *Chem. Phys.* 56 (1972) 2257-2261.
- 556 [49] C. Møller, M.S. Plesset, Note on an approximation treatment for many-electron systems, *Phys.*
557 *Rev.* 46 (1934) 618-622.
- 558 [50] A. Szabo, N.S. Ostlund, *Modern quantum chemistry. Introduction to advanced electronic*
559 *structure theory*, Dover Publication, Inc. New York, 1996.
- 560 [51] A.E. Reed, F. Weinhold, Natural bond orbital analysis of near-Hartree-Fock water dimer,
561 *J. Chem. Phys.* 78 (1983) 4066-4073.
- 562 [52] A.E. Reed, R.B. Weinstock, F. Weinhold, Natural population analysis, *J. Chem. Phys.* 83 (1985)
563 735-746.
- 564 [53] Gaussian 03, Revision C.02, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb,
565 J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S.
566 Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H.
567 Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y.
568 Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C.
569 Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli,
570 J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G.
571 Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K.
572 Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B.
573 Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-

574 Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W.
575 Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

576 [54] ChemAxon program, Budapest, Hungary. Available: www.chemaxon.com/products.html
577 (Accessed: April 2011)

578 [55] ALOGPS 2.1 Program. Available: <http://www.vcclab.org/lab/alogps> (Accessed: April 2011).

579

580 Captions to Figures

581 **Figure 1.** Structural representation for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones.

582 **Figure 2.** View of H2BzpClPh and H2BzpNO₂Ph showing the labeling of the non-H atoms and their
583 displacement ellipsoids at the 30% probability level.

584 **Figure 3.** View of [Ga(2AcPh)₂]⁺ showing the labeling of the non-H atoms and their displacement
585 ellipsoids at the 30% probability level.

586 **Figure 4.** Cytotoxic effect of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine- derived hydrazones and their
587 gallium(III) complexes on U87 and T98 glioma cells. Cells were treated with compounds (1 μmol·L⁻¹)
588 for 48 h and the cell survival was measured by MTT assay.

589 **Figure 5.** Cells treated with hydrazones (1 μmol·L⁻¹) exhibit characteristic morphological changes of
590 apoptosis. Control or treated T98, U87 and MRC5 cells were incubated in culture dishes. After 48 h,
591 treatment the dishes were observed under phase contrast and membrane morphology was
592 photographed. Changes such as cell rounding, cell shrinkage and blebs formation can be observed.
593 Amplification: 400X.

594 **Figure 6.** Cells treated with hydrazones exhibit nuclear changes characteristic of apoptosis. U87 (on
595 the left column) and MRC5 (on the right column) cells were treated with hydrazones (10⁻⁹ mol·L⁻¹) or
596 diluent (Control). After 48 h treatment, cells were fixed and stained with DAPI as described in Section
597 4.6. Chromatin condensation, nuclear fragmentation and apoptotic bodies can be observed.
598 Magnification: 400X.

599 **Scheme 1.** General scheme of synthesis of the gallium(III) complexes with hydrazones and structural
600 representation of the gallium(III) complexes.

Research Highlights

Hydrazones and their Ga(III) complexes are highly cytotoxic against glioma cells.

In some cases, complexation with gallium(III) improves the hydrazones' activities.

Most of the studied hydrazones were more cytotoxic than the reference drug etoposide.

Hydrazones induced morphological changes characteristic of apoptosis in glioma cells.

Table 1. Crystal data and structure refinement for H2BzpClPh, H2BzpNO₂Ph and [Ga(2AcPh)₂]⁺ (**1a**)

Compound	H2BzpClPh	H2BzpNO ₂ Ph	1a	
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₃ O	C ₁₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	C ₂₈ H ₂₄ GaN ₆ O ₂	
Formula weight (g·mol ⁻¹)	335.78	346.34	546.25	
Temperature (K)	150(2)	296(2)	293(2)	
Crystal system, space group	Triclinic, P $\bar{1}$	Monoclinic, P2 _{1/a}	Triclinic, P $\bar{1}$	
Crystal size (mm)	0.32 x 0.27 x 0.24	0.34 x 0.34 x 0.15	0.245 x 0.079 x 0.070	
Unit cell dimensions	a (Å)	8.6803(4)	13.9892(5)	11.632(1)
	b (Å)	8.8436(3)	7.4240(4)	12.137(1)
	c (Å)	11.3764(5)	15.6813(6)	12.161(1)
	α (°)	78.734(2)	90	95.624(5)
	β (°)	88.121(2)	92.611(3)	103.179(5)
	γ (°)	69.995(3)	90	111.515(4)
Volume (Å ³)	804.26(6)	1626.90(12)	1523.6(2)	
Z, Calculated density (Mg·m ⁻³)	2, 1.387	4, 1.414	2	
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.2500	0.099	0.935	
F(000)	348	720	562	
θ range for data collection (°)	3.65 to 26.00 °	3.25 to 25.02 °	2.79 to 25.99 °	
Limiting indices	-10 ≤ h ≤ 10	-16 ≤ h ≤ 14	-13 ≤ h ≤ 14	
	-10 ≤ k ≤ 10	-7 ≤ k ≤ 8	-14 ≤ k ≤ 14	
	-14 ≤ l ≤ 14	-18 ≤ l ≤ 18	-14 ≤ l ≤ 14	
Reflections collected / unique (R _{int})	7319 / 3093 (0.1144)	9023 / 2792 (0.0465)	14431 / 5938 (0.0640)	
Completeness	98.2 %, $\theta = 26.0$ °	97.1 %, $\theta = 25.02$ °	99.3 %, $\theta = 25.99$ °	
Absorption correction	Gaussian	None	None	
Data / restraints / parameters	3093 / 0 / 217	2792 / 0 / 235	5938 / 0 / 336	
Goodness-of-fit on F ²	1.055	1.035	1.011	
Final R indices [I > 2 σ (I)]	R1 = 0.0582, wR2 = 0.1533	R1 = 0.0492, wR2 = 0.1325	R1 = 0.0494, wR2 = 0.1220	
R indices (all data)	R1 = 0.0612, wR2 = 0.1579	R1 = 0.0608, wR2 = 0.1457	R1 = 0.0769, wR2 = 0.1318	
Largest diff. peak and hole (e·Å ⁻³)	0.543 and -0.509	0.142 and -0.169	0.302 and -0.403	

Table 2. Selected bond lengths (Å) for H2BzpClPh, H2BzpNO₂Ph, H2AcPh [30] and [Ga(2AcPh)₂]⁺ (**1a**)

Atoms	H2BzpClPh	H2BzpNO ₂ Ph	H2AcPh [30]	Atoms	1a
C(2)-C(7)	1.484(2)	1.488(2)	1.487(2)	C(12)-C(17)	1.461(5)
C(7)-N(2)	1.302(2)	1.2969(19)	1.264(3)	C(22)-C(27)	1.481(5)
N(2)-N(3)	1.3693(19)	1.3691(16)	1.375(2)	C(17)-N(12)	1.287(4)
N(3)-C(8)	1.366(2)	1.360(2)	1.347(3)	C(27)-N(22)	1.281(4)
C(8)-O(1)	1.215(2)	1.2136(19)	1.219(2)	N(12)-N(13)	1.378(3)
C(12)-Cl	1.7411(17)	---	---	N(22)-N(23)	1.379(3)
C(12)-N(4)	---	1.477(2)	---	N(13)-C(18)	1.321(4)
				N(23)-C(28)	1.326(4)
				C(18)-O(11)	1.295(4)
				C(28)-O(21)	1.296(4)
				Ga-O(11)	1.956(2)
				Ga-O(21)	1.960(2)
				Ga-N(11)	2.139(3)
				GaN(21)	2.115(3)
				Ga-N(12)	1.975(2)
				Ga-N(22)	1.988(2)

Table 3. Selected bond angles ($^{\circ}$) for H2BzpClPh, H2BzpNO₂Ph, H2AcPh [30] and [Ga(2AcPh)₂]⁺ (**1a**)

Atoms	H2BzpClPh	H2BzpNO ₂ Ph	H2AcPh [30]	Atoms	1a
C(2)-C(7)-N(2)	127.25(15)	128.03(13)	114.47(15)	C(12)-C(17)-N(12)	113.3(3)
C(7)-N(2)-N(3)	117.65(14)	117.97(13)	119.02(14)	C(22)-C(27)-N(22)	113.3(3)
N(2)-N(3)-C(8)	119.64(14)	119.69(13)	117.02(13)	C(17)-N(12)-N(13)	121.4(3)
N(3)-C(8)-O(1)	124.33(16)	124.01(14)	123.32(15)	C(27)-N(22)-N(23)	122.5(3)
N(3)-C(8)-C(9)	113.34(14)	113.60(13)	115.99(13)	N(12)-N(13)-C(18)	108.0(2)
O(1)-C(8)-C(9)	122.33(14)	122.38(14)	120.68(18)	N(22)-N(23)-C(28)	108.4(2)
				N(13)-C(18)-O(11)	125.1(3)
				N(23)-C(28)-O(21)	124.6(3)
				N(13)-C(18)-C(19)	116.3(3)
				N(23)-C(28)-C(29)	117.6(3)
				O(11)-C(18)-C(19)	118.7(3)
				O(21)-C(28)-C(29)	117.8(3)
				O(11)-Ga-O(21)	94.72(10)
				O(11)-Ga-N(12)	79.10(9)
				O(21)-Ga-N(12)	106.78(10)
				O(11)-Ga-N(22)	107.92(9)
				O(21)-Ga-N(22)	78.88(10)
				N(12)-Ga-N(22)	170.87(10)
				O(11)-Ga-N(21)	92.47(10)
				O(21)-Ga-N(21)	156.00(10)
				N(12)-Ga-N(21)	97.05(10)
				N(22)-Ga-N(21)	77.11(10)
				O(11)-Ga-N(11)	155.86(10)
				O(21)-Ga-N(11)	92.98(10)
				N(12)-Ga-N(11)	76.77(10)
				N(22)-Ga-N(11)	96.01(10)
				N(21)-Ga-N(11)	89.69(10)

Table 4. Experimental IC₅₀ values (nmol·L⁻¹) for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and etoposide reference drug against U87, T98 and MRC5 cells.

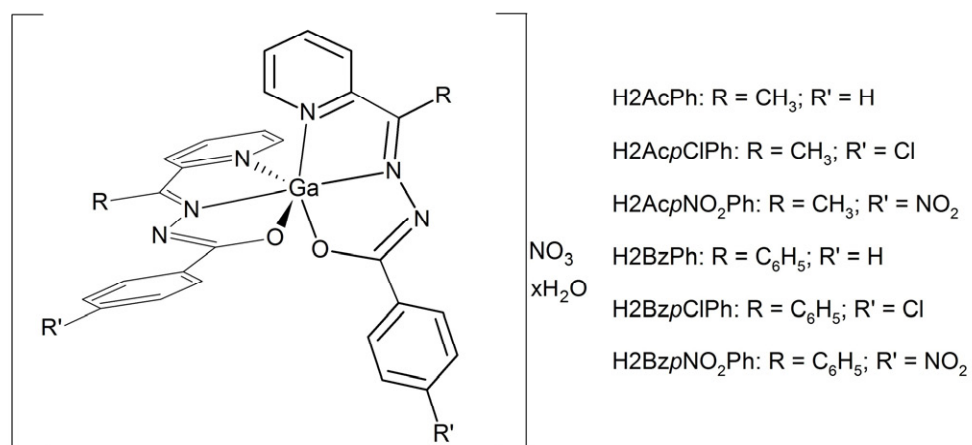
Compounds	Glioblastoma cell lines		Human fetal lung fibroblast
	U87	T98	(MRC5) cells
H2AcPh	0.94 ± 0.01	0.80 ± 0.07	284 ± 15
H2AcpClPh	0.07 ± 0.01	1.17 ± 0.32	348 ± 37
H2AcpNO ₂ Ph	0.57 ± 0.07	0.43 ± 0.04	283 ± 33
H2BzPh	8.26 ± 1.1	7.41 ± 0.42	1180 ± 127
H2BzpClPh	26.1 ± 14.6	415 ± 31	738 ± 13
H2BzpNO ₂ Ph	> 500	> 500	551 ± 53
Etoposide	620 ± 15	460 ± 25	---

Results are expressed as mean ± SD, n =4

Table 5. Calculated physico-chemical properties and experimental pIC₅₀ values for 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones

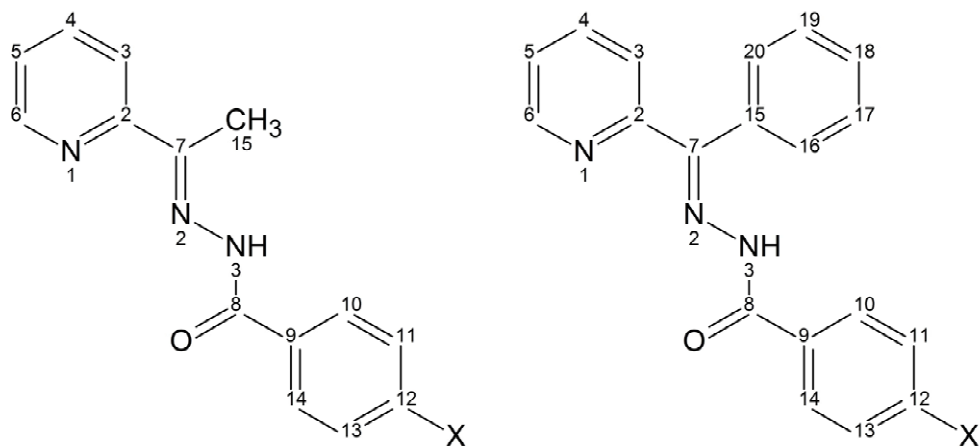
Compound	□ (HOMO)	□ (LUMO)	Dipole (db)	LogP	Surface area (Å ²)	Glioblastoma cell lines (pIC ₅₀)	
	(eV)*	(eV)				U87	T98
H2AcPh	-8.560 (<i>E</i> isomer)	1.978 (<i>E</i> isomer)	3.365 (<i>E</i> isomer)	1.92	342.28	9.026	9.096
	-8.545 (<i>Z</i> isomer)	1.780 (<i>Z</i> isomer)	5.308 (<i>Z</i> isomer)				
H2Ac _p ClPh	-8.692 (<i>E</i> isomer)	1.813 (<i>E</i> isomer)	3.381 (<i>E</i> isomer)	2.53	359.09	10.154	8.931
	-8.689 (<i>Z</i> isomer)	1.632 (<i>Z</i> isomer)	6.672 (<i>Z</i> isomer)				
H2Ac _p NO ₂ Ph	-8.898 (<i>E</i> isomer)	0.803 (<i>E</i> isomer)	4.717 (<i>E</i> isomer)	2.15	383.15	9.244	9.366
	-8.933 (<i>Z</i> isomer)	0.998 (<i>Z</i> isomer)	8.855 (<i>Z</i> isomer)				
H2BzPh	-6.801 (<i>E</i> isomer)	1.558 (<i>E</i> isomer)	3.104 (<i>E</i> isomer)	3.10	419.37	8.083	8.130
	-6.620 (<i>Z</i> isomer)	1.344 (<i>Z</i> isomer)	4.976 (<i>Z</i> isomer)				
H2Bz _p ClPh	-8.639 (<i>E</i> isomer)	1.814 (<i>E</i> isomer)	3.440 (<i>E</i> isomer)	3.68	436.41	7.583	6.381
	-8.346 (<i>Z</i> isomer)	1.527 (<i>Z</i> isomer)	6.386 (<i>Z</i> isomer)				
H2Bz _p NO ₂ Ph	-8.832 (<i>E</i> isomer)	0.833 (<i>E</i> isomer)	5.072 (<i>E</i> isomer)	3.31	459.15	< 6.301	< 6.301
	-8.549 (<i>Z</i> isomer)	0.955 (<i>Z</i> isomer)	8.585 (<i>Z</i> isomer)				

* eV = 627.51 Kcal·mol⁻¹



Scheme 1

ACCEPTED MANUSCRIPT



X = H, Cl or NO₂

Fig. 1

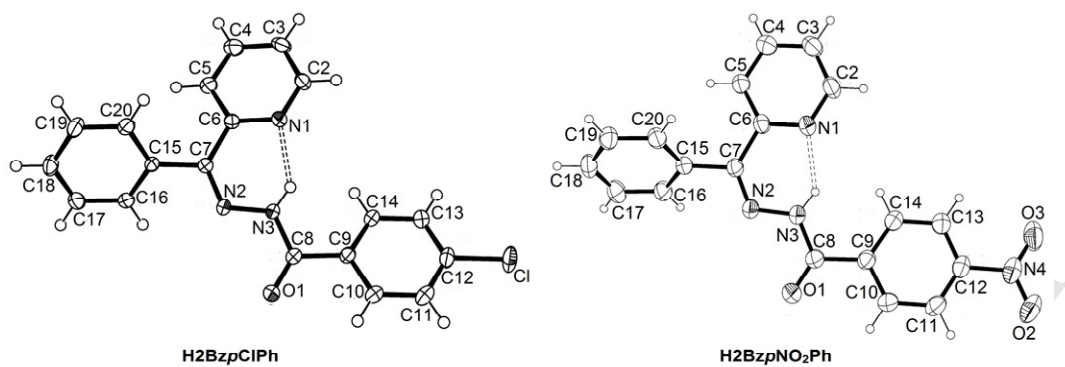


Fig. 2

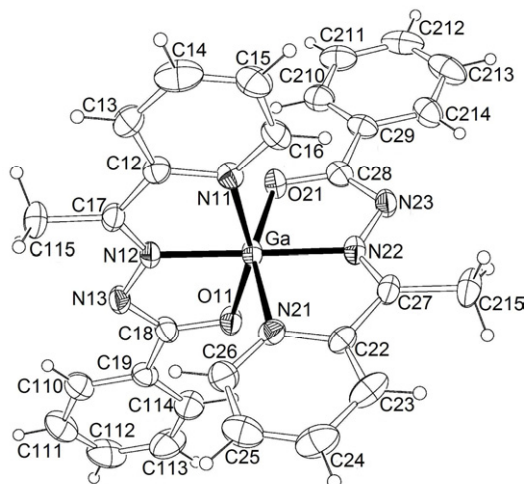


Fig. 3

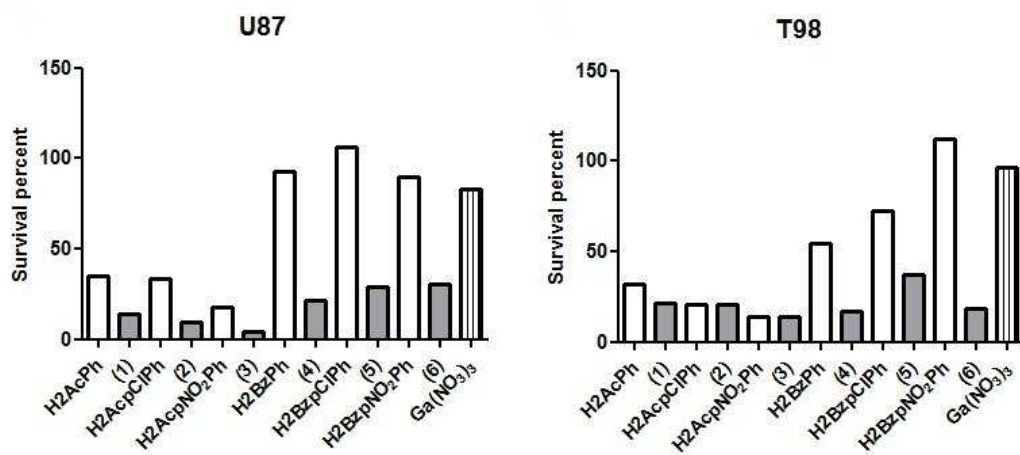


Fig. 4

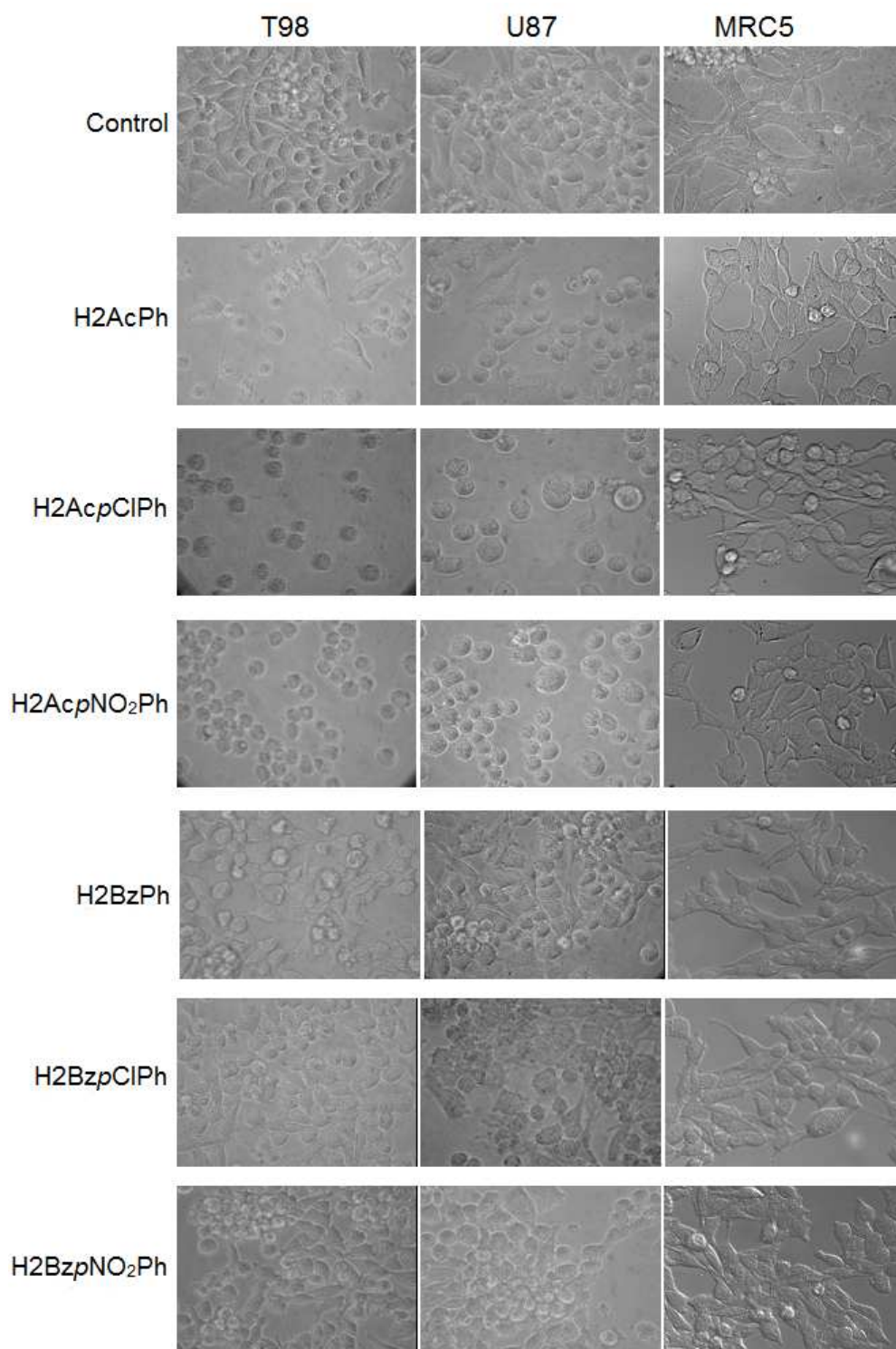


Fig. 5

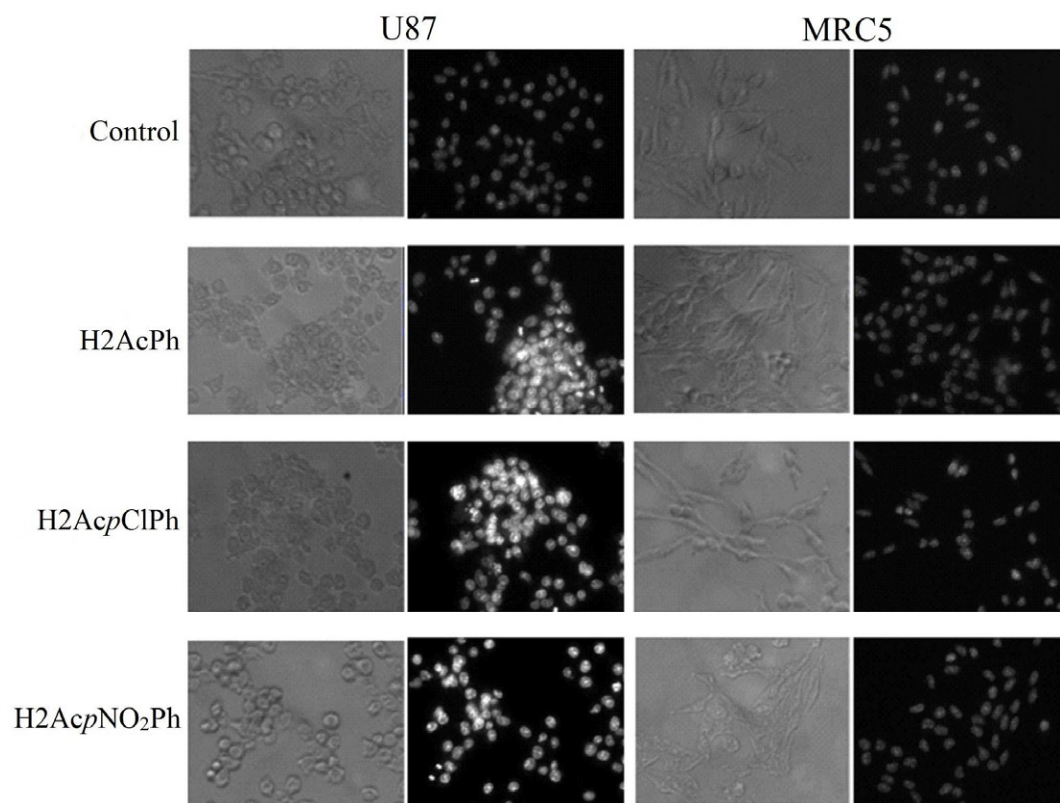


Fig. 6