

Novos complexos metálicos bioativos
com tiossemicarbazonas: investigação
do perfil farmacológico e de
mecanismos de ação

Josane Alves Lessa

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

Josane Alves Lessa

Novos complexos metálicos bioativos com
tiossemicarbazonas: investigação do perfil farmacológico
e de mecanismos de ação

Belo Horizonte

2012

UFMG-ICEX/DQ-880^a

T. 381

Josane Alves Lessa

Novos complexos metálicos bioativos com
tiossemicarbazonas: investigação do perfil farmacológico
e de mecanismos de ação

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

2012

Lessa, Josane Alves

L638 Novos complexos metálicos bioativos com
2012 tiossemicarbazonas: investigação do perfil
T farmacológico e de mecanismos de ação./ Josane Alves
Lessa. 2012.

xx: 152f. : il

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo

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

1.Química Inorgânica - Teses 2.Tiossemicarbazona -
Teses 3.Complexo metálico - Teses 4.Atividade
farmacológica - 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 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



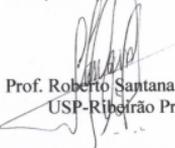
**"Novos Complexos Metálicos Bioativos com Tiossemicarbazonas: Investigação
do Perfil Farmacológico e de Mecanismos de Ação"**

Josane Alves Lessa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG


Profa. Maria Domingues Vargas
UFF


Prof. Roberto Santana da Silva
USP-Ribeirão Preto


Prof. Vito Modesto De Bellis
UFMG


Prof. Hélio Anderson Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2012.

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

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todos os meus familiares e pessoas intimamente ligadas à minha vida, que durante o curso me ofereceram apoio, carinho e compreensão. Em especial, dedico o trabalho aos meus pais Maria Nilce e Humberto, que sempre me ampararam, me incentivaram e me ensinaram a caminhar. É de vocês o mérito do sucesso que se diz meu.

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Profa. Heloisa pela orientação, apoio e dedicação durante a realização deste trabalho.
- ❖ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.
- ❖ Aos pesquisadores Dra. Isolda Maria de Castro Mendes (UFMG), Dr. Nivaldo Speziali (UFMG), Dra. Elaine M. S. Fagundes (UFMG), Dra. Valéria R. A. Pereira (Fiocruz-Recife) e Dra. Raquel Gouvêa dos Santos (CDTN) pela colaboração na realização deste trabalho.
- ❖ Às secretárias da Pós-graduação, Paulete, Lilian e Kátia obrigada pelo carinho, atenção e disposição.
- ❖ Aos colegas do laboratório 290, especialmente ao Angel, Anayive, Gabrieli, Isolda, Jeferson, Josane, Karina e Rafael pela amizade, carinho e por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável.
- ❖ Aos alunos de iniciação científica que colaboraram com a execução do trabalho, em especial Fernanda, Lucas, Lúcia, Nayane, Mariany e Sarah.
- ❖ Aos colegas e professores do Departamento de Química pela amizade e boa convivência ao longo dos anos.
- ❖ Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo.
- ❖ Ao Idrak por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário.
- ❖ À minha avó Tereza e aos meus irmãos Evanio, Fernando, Miriam, Ronaldo, Luciana e Humberto que torceram pela concretização deste curso.
- ❖ Aos meus pais Maria Nilce e Humberto, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.
- ❖ Ao meu Deus e Pai, que plantou esse sonho no meu coração e me sustentou até que se realizasse.

"Duas estradas se bifurcaram no meio da
minha vida,
Ouvi um sábio dizer.
Peguei a estrada menos usada.
E isso fez toda a diferença cada noite e
cada dia."

Larry Norman

RESUMO

No presente trabalho foram obtidos novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos derivados de tiossemicarbazonas e *bis*(tiossemicarbazonas) com ação antitumoral e antimicrobiana.

Para investigar do efeito da substituição sobre as atividades antimicrobiana e citotóxica de *N*(4)-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph, **1**), foram preparados seus derivados com os substituintes flúor, cloro, iodo e nitro nas posições *orto*-, *meta*- e *para* do grupo *N*(4)-fenil: H2Ac4*o*FPh (**2**), H2Ac4*m*FPh (**3**), H2Ac4*p*FPh (**4**), H2Ac4*o*ClPh (**5**), H2Ac4*m*ClPh (**6**), H2Ac4*p*ClPh (**7**), H2Ac4*o*IPh (**8**), H2Ac4*m*IPh (**9**), H2Ac4*p*IPh (**10**), H2Ac4*o*NO₂Ph (**11**), H2Ac4*m*NO₂Ph (**12**) e H2Ac4*p*NO₂Ph (**13**). A maioria dos compostos foi mais ou tão ativa quanto **1** contra *Staphylococcus aureus*. Todas as tiossemicarbazonas foram mais ativas do que fluconazol contra *Candida albicans*, sendo os compostos **9-13** mais ativos do que **1**. As tiossemicarbazonas **1-13** foram citotóxicas em doses nanomolares contra as linhagens de células tumorais U87 (glioma que expressa a proteína pró-apoptótica p53), T98G (glioma que expressa a proteína p53 mutante) e MCF-7 (carcinoma mamário) e apresentaram baixa atividade hemolítica. De acordo com estudos de relação estrutura-atividade, a atividade citotóxica de **1-13** está diretamente correlacionada com a energia do orbital HOMO e com a carga parcial do enxofre, e inversamente correlacionada com a área da superfície molecular das tiossemicarbazonas. A ação citotóxica de **1-13** pode ocorrer por vias que independem da proteína p53. As células expostas a **1-13** sofrem morte por apoptose e autofagia. A interação direta com microtúbulos não é o principal mecanismo de indução de apoptose por **1-13**.

Foram sintetizados os complexos de gálio(III) [Ga(2Ac4*p*FPh)₂]₂NO₃ (**1**), [Ga(2Ac4*p*ClPh)₂]₂NO₃ (**2**), [Ga(2Ac4*p*IPh)₂]₂NO₃ (**3**), [Ga(2Ac4*p*NO₂Ph)₂]₂NO₃·3H₂O (**4**) e [Ga(2Ac4*p*T)₂]₂NO₃ (**5**) com H2Ac4*p*FPh, H2Ac4*p*ClPh, H2Ac4*p*IPh, H2Ac4*p*NO₂Ph e *N*(4)-*para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*p*T). Estruturas de **1** e **5** foram determinadas por difração de raios X e indicam a presença de um centro de gálio(III) hexacoordenado a duas tiossemicarbazonas aniônicas coordenadas pelo sistema N_{py}-N-S. **1-5** foram mais ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* do que as tiossemicarbazonas livres, enquanto que a coordenação a gálio(III) não resultou em compostos mais ativos contra *S. aureus*. Os complexos também não se revelaram mais potentes do que suas tiossemicarbazonas contra células tumorais T98G, U87 e MCF-7.

Os complexos [Au(H2Ac4DH)Cl]·MeOH (**1**), [Au(H₂Ac4Me)Cl]Cl (**2**) [Au(H₂Ac4Ph)Cl]Cl·2H₂O (**3**) e [Au(H₂Bz4Ph)Cl]Cl (**4**) foram obtidos com 2-acetilpiridina

tiossemicarbazona (H2Ac4DH), seus derivados *N*(4)-metil- (H2Ac4Me) e *N*(4)-fenil- (H2Ac4Ph) substituídos e com *N*(4)-fenil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph). Os compostos foram citotóxicos contra células tumorais HL-60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HCT-116 (carcinoma colorretal humano). Células Jurkat e HL-60 foram mais sensíveis aos compostos do que células de tumores sólidos. A coordenação a Au(I) em **2** e **4** fez aumentar a atividade citotóxica de H2Ac4Me e H2Bz4Ph contra células HL-60 e Jurkat. **2** foi mais ativo do que auranofina contra ambas as linhagens. Todos os compostos induziram fragmentação do ADN em células HL-60 e Jurkat, sugerindo seus potenciais anti-apoptóticos. **2** inibiu a atividade de tiorredoxina redutase (TrxR), sugerindo que a inibição dessa enzima é parte de seu mecanismo de ação.

Foram obtidos os complexos [Au(H₂Gy3DH)]₂Cl₂ (**1**), [Au(H₂Gy3Me)]Cl₃ (**2**) e [Au(H₂Gy3Et)]Cl₃ (**3**) com glicoxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) (H₂Gy3DH) e seus derivados *N*(3)-metil- (H₂Gy3Me) e *N*(3)-etil- (H₂Gy3Et) substituídos. As *bis*(tiossemicarbazonas) e os complexos (**1-3**) demonstraram efeitos citotóxicos contra as células Jurkat, HL-60 e MCF-7, mas não contra células HCT-116. **2** inibiu a atividade de TrxR sugerindo que a enzima é um possível alvo biológico para a ação citotóxica desse complexo.

Complexos de [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**), [Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (**2**) [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (**4**) foram obtidos com *N*(4)-fenil-2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4Ph) e H2Ac4Ph. A coordenação a bismuto(III) resultou em compostos significativamente mais ativos contra *S. aureus* do que a coordenação a antimônio(III). Tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) apresentaram atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, porém apresentaram alta citotoxicidade em células saudáveis.

Complexos [Bi(H₂Gy3DH)Cl₃] (**1**), [Bi(H₂Gy3Et)(OH)₂Cl] (**2**) e [Bi(H₂Gy3Ph)Cl₃] (**3**) foram obtidos com H₂Gy3DH, H₂Gy3Et e *N*(3)-fenil glicoxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) (H₂Gy3Ph). As *bis*(tiossemicarbazonas) não foram ativas ou apresentam baixa atividade contra bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*. A coordenação a bismuto(III) fez aumentar significativamente a ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. faecalis*, constituindo assim uma estratégia interessante de redução de doses contra *essas* bactérias.

Palavras-chave: tiossemicarbazona, complexo metálico, atividade farmacológica, mecanismo de ação

ABSTRACT

In the present work novel thiosemicarbazones-derived drug and metal-based-drug candidates were obtained which present antitumor and antimicrobial activities.

To investigate the effect of substitution on the antimicrobial and cytotoxic activities of *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4Ph, **1**), its derivatives were prepared with fluorine, chlorine, iodine and nitro substituents in the *ortho*, *meta* and *para* positions of the *N*(4)-phenyl group: H2Ac4*o*FPh (**2**), H2Ac4*m*FPh (**3**), H2Ac4*p*FPh (**4**), H2Ac4*o*ClPh (**5**), H2Ac4*m*ClPh (**6**), H2Ac4*p*ClPh (**7**), H2Ac4*o*IPh (**8**), H2Ac4*m*IPh (**9**), H2Ac4*p*IPh (**10**), H2Ac4*o*NO₂Ph (**11**), H2Ac4*m*NO₂Ph (**12**) and H2Ac4*p*NO₂Ph (**13**).

Most of the compounds were more or as active as **1** against *Staphylococcus aureus*. All thiosemicarbazones were more active than fluconazole against *Candida albicans*, **9-13** being more active than **1**. Thiosemicarbazones **1-13** were cytotoxic at nanomolar doses against MCF-7 (breast adenocarcinoma), U87 (glioblastoma multiforme expressing wild-type pro-apoptotic p53 protein) and T98G (glioblastoma multiforme expressing mutant p53) tumor cell lines and demonstrated low hemolytic activity. According to structure-activity relationship studies, the cytotoxic activity of **1-13** is directly correlated to the energy of the HOMO orbital and to the partial charge of sulfur atom, and inversely correlated to the molecular surface area of thiosemicarbazones. The cytotoxic action of **1-13** may occur through pathways that are independent of p53 protein. Cells death on exposure to **1-13** occur by apoptosis and autophagy. Direct interaction with microtubules is not the main mechanism of apoptosis induction by **1-13**.

Complexes [Ga(2Ac4*p*FPh)₂]₂NO₃ (**1**), [Ga(2Ac4*p*ClPh)₂]₂NO₃ (**2**), [Ga(2Ac4*p*IPh)₂]₂NO₃ (**3**), [Ga(2Ac4*p*NO₂Ph)₂]₂NO₃·3H₂O (**4**) and [Ga(2Ac4*p*T)₂]₂NO₃ (**5**) were obtained with H2Ac4*p*FPh, H2Ac4*p*ClPh, H2Ac4*p*IPh, H2Ac4*p*NO₂Ph and *N*(4)-*para*-tolyl 2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4*p*T). The structures of **1** and **5** were determined by X-ray diffraction and indicate the presence of a gallium(III) center, which is hexacoordinated to two anionic thiosemicarbazones which bind to the metal through the N_{py}-N-S chelating system. **1-5** were more active than free thiosemicarbazones against *Pseudomonas aeruginosa* and *C. albicans*, whereas coordination to gallium(III) did not result in more active compounds against *S. aureus*. The gallium(III) complexes were also not more cytotoxic than their thiosemicarbazones against the T98G, U87 e MCF-7 cells.

Complexes [Au(H2Ac4DH)Cl]·MeOH (**1**), [Au(H₂2Ac4Me)Cl]Cl (**2**) [Au(H₂2Ac4Ph)Cl]Cl·2H₂O (**3**) and [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**) were prepared with 2-

acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4DH), its *N*(4)-methyl- (H2Ac4Me) and *N*(4)-phenyl- (H2Ac4Ph) derivatives, as well as with *N*(4)-phenyl 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H2Bz4Ph). The compounds were cytotoxic to Jurkat (immortalized line of T lymphocyte), HL-60 (acute myeloid leukemia), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HCT-116 (colorectal carcinoma) tumor cell lines. Jurkat and HL-60 cells were more sensitive to the compounds than the solid tumor cells. Upon coordinating to the Au(I) metal center in **2** and **4**, the cytotoxic activity of the H2Ac4Me and H2Bz4Ph ligands increases against the HL-60 and Jurkat tumor cell lines. **2** was more active than auranofin against both leukemia cells. All compounds induced DNA fragmentation in HL-60 and Jurkat cells indicating their pro-apoptotic potential. **2** strongly inhibited the activity of thioredoxin reductase (TrxR), which suggests inhibition of TrxR to be part of its mechanism of action.

Complexes [Au(H₂Gy3DH)]₂Cl₂ (**1**), [Au(H₂Gy3Me)]Cl₃ (**2**) and [Au(H₂Gy3Et)]Cl₃ (**3**) were synthesized with glyoxaldehyde *bis*(thiosemicarbazone) (H₂Gy3DH) and its *N*(3)-methyl- (H₂Gy3Me) and *N*(3)-ethyl- (H₂Gy3Et) derivatives. The *bis*(thiosemicarbazones) and **1-3** showed cytotoxic effects against Jurkat, HL-60 and MCF-7 cells, but not against HCT-116 cells. **2** inhibited the activity of TrxR, suggesting that the enzyme is a possible biologic target of its cytotoxic action.

Complexes [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**), [Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (**2**) [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**) and [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (**4**) were prepared with *N*(4)-phenyl-2-formylpyridine thiosemicarbazone (H2Fo4Ph) and H2Ac4Ph. Coordination to bismuth(III) resulted in compounds more active against *S. aureus* in comparison with coordination to antimony(III). Thiosemicarbazones and their Sb(III) complexes showed activity against *Trypanosoma cruzi*, but were highly cytotoxic to healthy cells.

Complexes [Bi(H₂Gy3DH)Cl₃] (**1**), [Bi(H₂Gy3Et)(OH)₂Cl] (**2**) and [Bi(H₂Gy3Ph)Cl₃] (**3**) were obtained with H₂Gy3DH, H₂Gy3Et and *N*(3)-phenyl glyoxaldehyde *bis*(thiosemicarbazone) (H₂Gy3Ph). The *bis*(thiosemicarbazones) were not active or demonstrated low activity against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *E. faecalis*. Coordination to bismuth(III) significantly increased the antibacterial activity against *S. aureus* and *E. faecalis*, constituting an interesting strategy to reduce doses against these bacterial strains.

Keywords: thiosemicarbazone, metal complex, pharmacological activity, mode of action

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura genérica de tiossemicarbazonas.....	7
Figura 1.2. Isômeros <i>Z</i> , <i>E</i> e <i>E'</i> de tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -piridínicas.....	3
Figura 1.3. Estrutura de tioacetazona, usada no tratamento de tuberculose.....	4
Figura 1.4. Representação esquemática da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR).....	4
Figura 1.5. Estruturas dos inibidores da enzima RDR: A) hidroxauréia e B) triapina.....	5
Figura 1.6. Estrutura genérica de <i>bis</i> (tiossemicarbazonas).....	5
Figura 1.7. Compostos de ouro(I) usados na clínica para tratamento de artrite reumatóide: (a) solganol, (b) miocrisina, (c) sanocrisina, (d) alocrisina e (e) auranofina.....	7
Figura 1.8. Representação da estrutura dimérica da enzima TrxR de mamíferos. As duas subunidades são mostradas nas cores azul claro e vermelho. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP ⁺) estão presentes na estrutura cristalina de TrxR, sendo mostrados em verde e azul, respectivamente.....	8
Figura 1.9. Exemplos de fármacos antimicrobianos: (a) cloridrato de tetraciclina, (b) ciprofloxacina, (c) cefalosporinas e (d) cloranfenicol.....	11
Figura 1.10. Exemplos de fármacos antifúngicos: (a) anfotericina B, (b) fluconazol e (c) flucitosina.....	12
Figura 1.11. Estruturas dos fármacos anti-chagásicos (a) nifurtimox e (b) benzonidazol.....	13
Figura 1.12. O ciclo celular e a relação e exemplos de quimioterápicos que atuam em fases específicas e inespecíficas do ciclo.....	14
Figura 2.1. Esquema de síntese de 2-acetilpiridina hidrazona.....	19
Figura 2.2. Esquema de síntese de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -, <i>m</i> - e <i>p</i> -X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO ₂).....	20
Figura 2.3. Esquema de síntese complexos de gálio(III) com <i>N</i> (4)- <i>p</i> X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X =, Cl, I, NO ₂ , CH ₃).....	21
Figura 2.4. Esquemas de síntese de A) H ₂ Ac ₄ DH, H ₂ Ac ₄ Me, H ₂ Ac ₄ Ph, H ₂ Fo ₄ Ph e B) H ₂ Bz ₄ Ph.....	22
Figura 2.5. Esquemas de síntese de complexos de antimônio(III) e bismuto(III) com H ₂ Fo ₄ Ph e H ₂ Ac ₄ Ph.....	23

Figura 2.6. Esquemas de síntese de complexos de ouro(I) com H ₂ Ac ₄ DH, H ₂ Ac ₄ Me e H ₂ Ac ₄ Ph e H ₂ Bz ₄ Ph.....	24
Figura 2.7. Esquemas de síntese de H ₂ Gy ₃ DH, H ₂ Gy ₃ Me, H ₂ Gy ₃ Et e H ₂ Gy ₃ Ph.....	24
Figura 2.8. Esquemas de síntese complexos de bismuto(III) com H ₂ Gy ₃ DH, H ₂ Gy ₃ Me, H ₂ Gy ₃ Et e H ₂ Gy ₃ Ph.....	25
Figura 2.9. Esquemas de síntese de complexos de ouro(I) e ouro(III) com de H ₂ Gy ₃ DH, H ₂ Gy ₃ Me e H ₂ Gy ₃ Et.....	26
Figura 3.1. Estruturas de H ₂ Ac ₄ Ph e de seus derivados <i>N</i> (4)- <i>o</i> -, <i>m</i> - e <i>p</i> -X-fenil (X = F, Cl, I ou NO ₂).....	36
Figura 3.1.1. Espectro de infravermelho de H ₂ Ac ₄ <i>o</i> FPh (2), obtido em pastilha de KBr (4000-400 cm ⁻¹).....	38
Figura 3.1.2. Isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> das tiossemicarbazonas substituídas em <i>N</i> (4)-fenil e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes. X = F, Cl, I ou NO ₂	39
Figura 3.1.3. Espectro de RMN de ¹ H de H ₂ Ac ₄ <i>m</i> FPh (3), obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	40
Figura 3.1.4. Espectro de RMN de ¹³ C de H ₂ Ac ₄ <i>m</i> FPh (3) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	41
Figura 3.2.1. Diagramas ORTEP de H ₂ Ac ₄ <i>o</i> FPh (2), H ₂ Ac ₄ <i>m</i> FPh (3), H ₂ Ac ₄ <i>p</i> FPh (4), H ₂ Ac ₄ <i>m</i> ClPh (6), H ₂ Ac ₄ <i>p</i> ClPh (7), H ₂ Ac ₄ <i>o</i> IPh (8), H ₂ Ac ₄ <i>p</i> IPh (10) e H ₂ Ac ₄ <i>o</i> NO ₂ Ph (11).....	45
Figura 3.2.2. Empacotamento molecular de H ₂ Ac ₄ <i>m</i> FPh (3 , esquerda) e H ₂ Ac ₄ <i>o</i> NO ₂ Ph (11 , direita), evidenciando a ligação de hidrogênio intermolecular N(3)—H(3)···S(1).....	46
Figura 3.3.1. Distribuição das densidades HOMO para 1 - 13 . Valor de contorno: 0,018.....	57
Figura 3.3.2. Fotografia obtida em microscópio contraste de fase de células MCF-7, T98G e U87 controle (acima) e tratadas (abaixo) com 2 (1 μmol L ⁻¹) por 48 h. Ampliação: 400x.....	58
Figura 3.3.3. Fotografia obtida em microscópio de fluorescência de células MCF-7, T98G e U87 controle (acima) e tratadas com 2 (abaixo) na presença do marcador DAPI. Células expostas a 2 (1 μmol L ⁻¹) por 48 h apresentam fragmentação do ADN em comparação às células controle.....	58
Figura 3.3.4. Fotografia obtida em microscópio de fluorescência de células MCF-7, T98G e U87 controle (acima) e tratadas com 2 (abaixo) na presença de brometo de etídio e laranja	

de acridina.....	56
Figura 3.3.5. Inibição <i>in vitro</i> de polimerização da tubulina promovida por H2Ac4pClPh (7) em comparação com colchicina.....	59
Figura 3.3.6. Imunofluorescência para detecção de células HeLa em mitose. Células HeLa foram tratadas com veículo (controle DMSO 0,1 %), (b) colchicina (2 nmol L ⁻¹) ou (c) 7 (12,5 μmol L ⁻¹), seguida por marcação simultânea de α-tubulina (verde), fosfohistona H3 (vermelho) e do núcleo (azul). Ampliação: 200x.....	60
Figura 4.1. Estrutura genérica das N(4)-para-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = Cl, F, I, NO ₂ e CH ₃) utilizadas na síntese de complexos de gálio(III) e numeração adotada para atribuição dos átomos.....	62
Figura 4.1.1. Estrutura genérica dos complexos de gálio(III) (1-5).....	63
Figura 4.1.2. Espectros de infravermelho A) da tiossemicarbazoa H2Ac4pNO ₂ Ph e B) do complexo [Ga(2Ac4pNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·3H ₂ O (4), obtidos em CsI, na região de 710-180 cm ⁻¹	66
Figura 4.1.3. Espectros dos complexos [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ (1) e [Ga(2Ac4pNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·3H ₂ O (4), obtidos em KBr, na região de 4000 - 400 cm ⁻¹	66
Figura 4.1.4. Espectros de RMN de ¹ H de A) H2Ac4pIPh e B) [Ga(2Ac4pIPh) ₂]NO ₃ (3) (DMSO- <i>d</i> ₆).....	68
Figura 4.1.5. Espectros de RMN de ¹³ C de A) H2Ac4pIPh e B) (3) (DMSO- <i>d</i> ₆).....	69
Figura 4.2.1. Diagramas ORTEP de [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ ·DMSO (1a) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ ·DMSO (5a).....	71
Figura 5.1.1.1. Estruturas das tiossemicarbazonas H2Fo4Ph e H2Ac4Ph (isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>), as quais foram utilizadas para as sínteses dos complexos (1-4) e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.....	79
Figura 5.1.1.2. Estruturas dos complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl ₂] (2), [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂] (4).....	80
Figura 5.1.1.3. Espectros de infravermelho: A) da tiossemicarbazona H2Fo4Ph e B) do complexo [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3).....	82
Figura 5.1.1.4. Espectros de RMN de ¹ H: A) da tiossemicarbazona H2Ac4Ph e B) do complexo [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3), obtidos em MeOD- <i>d</i> ₄	83
Figura 5.1.2.1. Diagrama ORTEP de: A) [H ₂ 2Fo4Ph]Cl, B) [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂].2DMSO (1a), C) [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e D) [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂ (DMSO)] (4a).....	85

Figura 5.1.2.2. Diagrama ORTEP de: A) [Sb(mtsc)Cl ₂] e B) [Bi(mtsc) ₂ NO ₃].....	85
Figura 5.1.2.3. Empacotamento ou contatos a curta distância de: A) [H ₂ Fo4Ph]Cl, B) [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]·2DMSO (1a) e C) [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3).....	87
Figura 5.1.2.4. Contatos a curta distância de [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂ (DMSO)] (4a) e [Bi(diglima)Cl ₃], evidenciando interação entre bismuto(III) e Cl(1) (linhas pontilhadas), a qual é relevante para a formação de dímeros.....	88
Figura 5.1.2.5. Empacotamento molecular de [Bi(2Ac4Ph)(DMSO)Cl ₂] (4a), mostrando a cadeia ao longo da direção (100) formada pela ligação de hidrogênio N(4)—H(4A)···Cl ₂ (linhas pontilhadas).....	89
Figura 5.1.3.1. Estruturas e valores de logP calculados para as tiossemicarbazonas H ₂ Fo4Ph, H ₂ Ac4Ph e H ₂ Bz4Ph.....	94
Figura 5.2.1.1. Estruturas das tiossemicarbazonas H ₂ Ac4DH, H ₂ Ac4Me, H ₂ Ac4Ph e H ₂ Bz4Ph, as quais foram utilizadas nas sínteses dos complexos (1-4) e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.....	97
Figura 5.2.1.2. Estruturas dos complexos [Au(H ₂ Ac4DH)Cl]·CH ₃ OH (1), [Au(H ₂ Ac4Me)Cl]Cl (2), [Au(H ₂ Ac4Ph)Cl]Cl·2H ₂ O (3) e [Au(H ₂ Bz4Ph)Cl]Cl (4).....	98
Figura 5.2.1.3. Curvas TG e DTG obtidas para o complexo [Au(H ₂ Ac4DH)Cl]·CH ₃ OH (1) (31-1000 °C, N ₂).....	99
Figura 5.2.1.4. Espectros de infravermelho A) da tiossemicarbazona H ₂ Bz4Ph e B) do complexo [Au(H ₂ Bz4Ph)Cl]Cl (4).....	101
Figura 5.2.1.5. Espectros de RMN de ¹ H na região entre 16,4 a 6,8 ppm de: A) da tiossemicarbazona H ₂ Ac4Me e B) do complexo (2) (DMSO- <i>d</i> ₆).....	102
Figura 5.2.1.6. Espectros de RMN de ¹ H: A) da tiossemicarbazona H ₂ Ac4Me e B) do complexo [Au(H ₂ Ac4Me)Cl]Cl (2) obtidos em MeOD- <i>d</i> ₄	103
Figura 5.2.2.1. Estruturas de [Au(H ₂ Ac4DH)Cl]Cl·H ₂ O (1a , esquerda) e [Au(H ₂ Bz4Ph)Cl]Cl (4 , direita). As interações intermoleculares <i>via</i> ligação de hidrogênio estão pontilhadas. Em 1a , os átomos Cl2A, Cl2B e Cl2C foram gerados por transformações de simetria.....	106
Figura 5.2.3.1. Efeito citotóxico de tiossemicarbazonas, seus complexos (1-4), auranofina e cisplatina contra linhagens de células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116. As células foram tratadas com os compostos (10 μmol L ⁻¹) por 48h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média ± erro padrão em comparação com o	

controle (células tratadas com DMF, 0,1%) de três experimentos independentes realizados em triplicata.....	110
Figura 5.2.3.2. Porcentagem de fragmentação de ADN em células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116 induzida por tiossemicarbazonas, complexos (1-4), auranofina (10 µM) e DMF 0,1% (controle). Os dados são expressos como média ± erro padrão de porcentagem de fragmentação de ADN.....	114
Figura 5.2.3.3. Mobilidade eletroforética em gel de agarose (1 %) de ADN plasmidial pGEM®-T incubado com DMF 2,5% (controle), H2Ac4Me, 2 ou H ₂ AuCl ₄ (100 µmol L ⁻¹) a 37 °C em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mmol L ⁻¹ , Tris-HCl 5 mmol L ⁻¹ , pH 7,2) por 24h.....	115
Figura 5.2.3.4. Efeito inibitório do complexo (2) sobre a atividade de TrxR. A curva log (inibidor, 2) vs resposta (absorbância) foi obtida para determinação de CI ₅₀ . TrxR foi tratada por 1 h a 37 °C com o complexo (2) em dez diferentes concentrações na faixa de 0,05 a 50 µmol L ⁻¹ e a atividade da enzima foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Representação de dados de experimentos realizados em triplicata.....	116
Figura 5.2.3.5. Efeito inibitório H2Ac4Me, 2 , H ₂ AuCl ₄ e auranofina sobre a atividade de TrxR. A enzima foi incubada com DMF 2,5% (controle) e com os compostos nas concentrações 0,5, 5,0 e 10,0 µmol L ⁻¹ por 1h a 37 °C. A atividade de TrxR foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Os dados são expressos como média ± erro padrão da atividade de TrxR.....	116
Figura 6.1.1.1. Estruturas das <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) H ₂ Gy3DH, H ₂ Gy3Et e H ₂ Gy3Ph, utilizadas nas sínteses dos complexos (1-3), e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.....	119
Figura 6.1.1.2. Estruturas propostas para os complexos [Bi(H ₂ Gy3DH)Cl ₃] (1), [Bi(H ₂ Gy3Et)(OH) ₂ Cl] (2) e [Bi(H ₂ Gy3Ph)Cl ₃] (3).....	120
Figura 6.1.1.3. Espectros de infravermelho A) de H ₂ Gy3Et e B) de Bi(H ₂ Gy3Et)(OH) ₂ Cl] (2), obtidos em nujol/CsI, na região de 710-180 cm ⁻¹	122
Figura 6.1.1.4. Espectros de RMN ¹ H A) de H ₂ Gy3Ph e B) de [Bi(H ₂ Gy3Ph)Cl ₃] (3) em DMSO- <i>d</i> ₆	123
Figura 6.1.1.5. Espectros de RMN ¹ H A) de H ₂ Gy3Ph e B) de [Bi(H ₂ Gy3Ph)Cl ₃] (3) em DMF- <i>d</i> ₇	124

Figura 6.1.1.6. Espectros de RMN ¹ H A) de H ₂ Gy3Ph e B) de [Bi(H ₂ Gy3Ph)Cl ₃] (3) em acetona- <i>d</i> ₆ . (faixa = 11,2 – 6,8 ppm).....	124
Figura 6.1.1.7. Espectros de RMN de ¹³ C A) de H ₂ Gy3Ph e B) do complexo [Bi(H ₂ Gy3Ph)Cl ₃] (3) em DMSO- <i>d</i> ₆	125
Figura 6.1.1.8. Espectros eletrônicos dos complexos [Bi(H ₂ Gy3DH)Cl ₃] (1), [Bi(H ₂ Gy3Et)(OH) ₂ Cl] (2) e [Bi(H ₂ Gy3Ph)Cl ₃] (3) e de seus respectivos ligantes em DMF.....	125
Figura 6.1.1.9. Estruturas de complexos de bismuto(III) com <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) e <i>bis</i> (semicarbazonas): A) [Bi(dapts)(N ₃)] (H ₂ dapts = 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (tiossemicarbazona), B) [Bi(Hdapt)Cl ₂]·DMSO·H ₂ O e C) [Bi(dapt)(OH)] (H ₂ dapt = 2,6-diacetilpiridina <i>is</i> (2-tiofenil hidrazona).....	128
Figura 6.2.1.1. Estruturas das <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) H ₂ Gy3DH, H ₂ Gy3Me e H ₂ Gy3Et, utilizadas nas sínteses dos complexos (1-3), e numeração adotada para atribuição dos átomos onstituintes.....	129
Figura 6.2.1.2. Estruturas propostas para os complexos [Au ₂ (H ₂ Gy3DH) ₂]Cl ₂ (1), [Au(H ₂ Gy3Me)]Cl ₃ (2) e [Au(H ₂ Gy3Et)]Cl ₃ (3).....	130
Figura 6.2.1.3. Espectros de infravermelho de A) H ₂ Gy3DH e B) [Au ₂ (H ₂ Gy3DH) ₂]Cl ₂ (2), obtidos em pastilha de KBr na região de 3800-400cm ⁻¹	133
Figura 6.2.1.4. Estruturas de A) de piridil <i>bis</i> {3-hexametileno-iminiltiossemicarbazona} (H ₂ Plhexim) e B) de [Au(H ₂ Plhexim)] ₂ ⁺²	134
Figura 6.2.1.5. Espectros de RMN ¹ H A) de H ₂ Gy3Et e B) de [Au(H ₂ Gy3Et)]Cl ₃ (3) em DMSO- <i>d</i> ₆	135
Figura 6.2.1.6. Espectros de A) RMN ¹³ C e B) DEPT de [Au(H ₂ Gy3Et)]Cl ₃ (3) em DMSO- <i>d</i> ₆	135
Figura 6.2.1.7. Espectros de RMN de ¹³ C: A) de H ₂ Gy3Et e B) de [Au(H ₂ Gy3Et)]Cl ₃ (3) em DMSO- <i>d</i> ₆	136
Figura 6.2.1.8. Espectros eletrônicos de A) H ₂ Gy3DH e 1 e de B) H ₂ Gy3Me, H ₂ Gy3Et, 2 e 3	137
Figura 6.2.1.9. Voltamogramas cíclicos A) das <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) H ₂ Gy3DH, H ₂ Gy3Me e H ₂ Gy3Et e B) de H ₂ Gy3Et obtidos em quatro faixa de potencial, evidenciando a dependência entre os processos redox. Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ (DMF).....	138
Figura 6.2.1.10. Voltamogramas cíclicos dos complexos (1-3) obtidos em DMF sob	

atmosfera de nitrogênio. Velocidade de varredura:100 mV s ⁻¹	139
Figura 6.2.1.11. Comparação entre comportamentos eletroquímicos de A) H ₂ Gy3DH, 1 e H ₂ AuCl ₄ e de B) H ₂ Gy3Et, 3 e H ₂ AuCl ₄ . Processos redox atribuídos ao centro metálico nos complexos são indicados por setas.....	140
Figura 6.2.2.1. Efeito citotóxico de <i>bis</i> (tiossemicarbazonas), seus complexos (1-3), auranofina e cisplatina contra linhagens de células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116. As células foram tratadas com os compostos (10 μmol L ⁻¹) por 48h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média ± desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMF, 0,1%) de três experimentos independentes realizados em triplicata.....	142
Figura 6.2.2.2. Efeito inibitório do complexo (2) sobre a atividade de TrxR. A curva log [inibidor, 2] vs resposta (absorbância) foi obtida para determinação de CI ₅₀ . TrxR foi tratada por 1 h a 37 °C com o complexo (2) em dez diferentes concentrações na faixa de 0,05 a 50 μmol L ⁻¹ e a atividade da enzima foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Representação de dados de experimentos realizados em triplicata.....	143
Figura 6.2.2.3. Efeito inibitório H ₂ Gy3Me, 2 , H ₂ AuCl ₄ e auranofina sobre a atividade de TrxR. A enzima foi incubada com DMF 2,5% (controle) e com os compostos nas concentrações 0,5, 5,0 e 10,0 μmol L ⁻¹ por 1 h a 37 °C. A atividade de TrxR foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Os dados são expressos como média ± desvio padrão da atividade de TrxR.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fármacos e agentes de imagem à base de metais usados na clínica.....	2
Tabela 1.2. Modalidades de morte celular e características morfológicas relacionadas.....	15
Tabela 2.1. Tipo de eletrólito para soluções 10^{-3} mol L ⁻¹ em dimetilformamida ou metanol..	17
Tabela 3.1.1. Cores, temperaturas de fusão, massas molares e rendimentos de reações para <i>N</i> (4)- <i>o</i> -, <i>m</i> - e <i>p</i> -X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, I ou NO ₂).....	37
Tabela 3.1.2. Atribuição das principais bandas de infravermelho (cm ⁻¹) de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -, <i>m</i> - e <i>p</i> -X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, I ou NO ₂).....	38
Tabela 3.1.3. Atribuição (A), número de hidrogênios (N ^o), multiplicidade e deslocamento químico (δ) dos sinais de RMN de ¹ H do isômero <i>E</i> de H2Ac4 <i>o</i> FPh (2), H2Ac4 <i>m</i> FPh (3), H2Ac4 <i>p</i> FPh (4), H2Ac4 <i>o</i> IPh (8), H2Ac4 <i>m</i> IPh (9) e H2Ac4 <i>p</i> IPh (10), H2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph (11) e H2Ac4 <i>m</i> NO ₂ Ph (12) em comparação com H2Ac4Ph (1) (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	42
Tabela 3.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 de H2Ac4 <i>o</i> FPh (2), H2Ac4 <i>m</i> FPh (3), H2Ac4 <i>p</i> FPh (4), H2Ac4 <i>o</i> IPh (8), H2Ac4 <i>m</i> IPh (9), H2Ac4 <i>p</i> IPh (10) e H2Ac4 <i>m</i> NO ₂ Ph (12) em comparação com H2Ac4Ph (1) (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	43
Tabela 3.2.1. Resumo da coleção de dados e refinamento de 2-4, 6-8, 10 e 11.....	47
Tabela 3.2.2. Distâncias de ligação selecionadas (Å) de H2Ac4 <i>o</i> FPh (2), H2Ac4 <i>m</i> FPh (3), H2Ac4 <i>p</i> FPh (4), H2Ac4 <i>m</i> ClPh (6), H2Ac4 <i>p</i> ClPh (7), H2Ac4 <i>o</i> IPh (8), H2Ac4 <i>p</i> IPh (10), H2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph (11), 1 e 5.....	48
Tabela 3.2.3. Ângulos de ligação selecionados (°) de H2Ac4 <i>o</i> FPh (2), H2Ac4 <i>m</i> FPh (3), H2Ac4 <i>p</i> FPh (4), H2Ac4 <i>m</i> ClPh (6), H2Ac4 <i>p</i> ClPh (7), H2Ac4 <i>o</i> IPh (8), H2Ac4 <i>p</i> IPh (10), H2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph (11), 1 e 5.....	48
Tabela 3.2.4. Ligações de hidrogênio nas estruturas de H2Ac4 <i>o</i> FPh (2), H2Ac4 <i>m</i> FPh (3), H2Ac4 <i>p</i> FPh (4), H2Ac4 <i>m</i> ClPh (6), H2Ac4 <i>p</i> ClPh (7), H2Ac4 <i>o</i> IPh (8), H2Ac4 <i>p</i> IPh (10) e H2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph (11).....	49
Tabela 3.3.1. Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>S.aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> das tiossemicarbazonas 1-13 em comparação com cloridrato de tetraciclina e fluconazol.....	50

Tabela 3.3.2. Efeito citotóxico (CI ₅₀) contra células RT2 e T98G e atividade hemolítica de H2Ac4Ph (1) e de seus derivados H2Ac4oCℓPh (5), H2Ac4mCℓPh (6), H2Ac4pCℓPh (7), H2Ac4oT (14), H2Ac4mT (15) e H2Ac4pT (16).....	51
Tabela 3.3.3. Efeito citotóxico (CI ₅₀) contra células T98G, U87 e MCF-7 e atividade hemolítica de 1-13 em comparação com etoposídeo.....	52
Tabela 3.3.4. Valores experimentais de pCI ₅₀ (-log CI ₅₀) contra células T98G, U87 e MCF-7 e de propriedades calculadas de 1-13.....	55
Tabela 3.3.5. Matrizes de correlação entre propriedades estéreo-eletrônicas e atividades citotóxicas de tiossemicarbazonas 1-13.....	56
Tabela 3.3.6. Resultado de análise multiparamétrica de interrupção de mitose por colchicina e 7 em células HeLa.....	61
Tabela 4.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão, análise elementar, massa molar (MM) e condutividade molar de [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ (1), [Ga(2Ac4pCℓPh) ₂]NO ₃ (2), [Ga(2Ac4pIPh) ₂]NO ₃ (3), [Ga(2Ac4pNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·3H ₂ O (4) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ (5).....	64
Tabela 4.1.2. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das tiossemicarbazonas e de [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ (1), [Ga(2Ac4pCℓPh) ₂]NO ₃ (2), [Ga(2Ac4pIPh) ₂]NO ₃ (3), [Ga(2Ac4pNO ₂ Ph) ₂]NO ₃ ·3H ₂ O (4) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ (5).....	65
Tabela 4.1.3. Atribuições (A), multiplicidade (M), número de hidrogênios (n ^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H de complexos (1-5) em comparação com as tiossemicarbazonas HL ₁ – HL ₅ (DMSO- <i>d</i> ₆).....	70
Tabela 4.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT 135 (D) de complexos (1-5) em comparação com as tiossemicarbazonas HL ₁ – HL ₅ (DMSO- <i>d</i> ₆).....	70
Tabela 4.2.1. Resumo da coleção de dados e refinamento para [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ ·DMSO (2a) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ ·DMSO (5a).....	73
Tabela 4.2.2. Comprimentos de ligação (Å) selecionados de [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ ·DMSO (1a) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ ·DMSO (5a) em comparação com H2Ac4Ph, [Ga(2Ac4Ph) ₂]NO ₃ ·DMSO e H2Ac4pFPh.....	74
Tabela 4.2.3. Ângulos de ligação (°) selecionados de [Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ ·DMSO (2a) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ ·DMSO (5a) em comparação com H2Ac4Ph, [Ga(2Ac4Ph) ₂]NO ₃ ·DMSO e H2Ac4pFPh.....	74
Tabela 4.2.4. Ligações de hidrogênio calculadas para Ga(2Ac4pFPh) ₂]NO ₃ ·DMSO (2a) e [Ga(2Ac4pT) ₂]NO ₃ ·DMSO (5a).....	75

Tabela 4.3.1. Atividade contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> das tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), nitrato de gálio, cloridrato de tetraciclina e fluconazol.....	75
Tabela 4.3.2. Efeito citotóxico (CI ₅₀) contra células T98G, U87 e MCF-7 e atividade hemolítica de tiossemicarbazonas e seus complexos de gálio(III) em comparação com etoposídeo.....	77
Tabela 5.1.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão, análise elementar, massa molar (MM) e condutividade molar dos complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl ₂] (2) [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂] (4).....	80
Tabela 5.1.1.2. Atribuição de bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das tiossemicarbazonas H ₂ Fo4Ph e H ₂ Ac4Ph e de seus complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl ₂] (2), [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂] (4).....	82
Tabela 5.1.1.3. Atribuição, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n ^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H de [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1), Bi(2Fo4Ph)Cl ₂] (2) e [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) em comparação com H ₂ Fo4Ph e H ₂ Ac4Ph (MeOD- <i>d</i> ₄).....	84
Tabela 5.1.2.1. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento de H ₂ Fo4Ph·HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]·2DMSO (1a), [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)(DMSO)Cl ₂] (4a).....	90
Tabela 5.1.2.2. Distâncias de ligação selecionadas (Å) de [H ₂ Fo4Ph]Cl, [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]·2DMSO (1a), [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂ (DMSO)] (4a) em comparação com H ₂ Ac4Ph, Hmtsc, Sb(mtsc)Cl ₂] e [Bi(mtsc) ₂ NO ₃].....	91
Tabela 5.1.2.3. Ângulos de ligação selecionados (Å) de [H ₂ Fo4Ph]Cl, [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]·2DMSO (1a), [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂ (DMSO)] (4a) em comparação com H ₂ Ac4Ph, Hmtsc, [Sb(mtsc)Cl ₂] e [Bi(mtsc) ₂ NO ₃].....	92
Tabela 5.1.2.4. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio calculados para [H ₂ Fo4Ph]Cl, [Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]·2DMSO (1a), [Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl ₂ (DMSO)] (4a).....	93
Tabela 5.1.3.1. Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> das tiossemicarbazonas, seus complexos de antimônio(III) e bismuto(III), SbCl ₃ , BiCl ₃ e de cloridrato de tetraciclina.....	94

Tabela 5.1.3.2. Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> das tiossemicarbazonas livres, seus complexos de bismuto(III), cloridrato de tetraciclina e ciprofloxacina.....	95
Tabela 5.1.3.3. Citotoxicidade e atividade anti- <i>T. cruzi</i> de H ₂ Fo ₄ Ph, H ₂ Ac ₄ Ph e H ₂ Bz ₄ Ph, seus complexos de antimônio(III), e SbCl ₃ em comparação com os fármacos de referência benznidazol e nifurtimox.....	96
Tabela 5.2.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão, análise elementar, massa molar (MM) e condutividade molar dos complexos de ouro(I) [Au(H ₂ Ac ₄ DH)Cl]·CH ₃ OH (1), [Au(H ₂ Ac ₄ Me)Cl]Cl (2), [Au(H ₂ Ac ₄ Ph)Cl]Cl·2H ₂ O (3) e [Au(H ₂ Bz ₄ Ph)Cl]Cl (4).....	99
Tabela 5.2.1.2. Atribuição de bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das tiossemicarbazonas e de seus complexos de ouro(I) (1-4).....	100
Tabela 5.2.1.3. Atribuição, multiplicidade (M), número de hidrogênios (n ^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H das tiossemicarbazonas e dos complexos [Au(H ₂ Ac ₄ DH)Cl]·CH ₃ OH (1) [Au(H ₂ Ac ₄ Me)Cl]Cl (2), [Au(H ₂ Ac ₄ Ph)Cl]Cl·2H ₂ O (3) e [Au(H ₂ Bz ₄ Ph)Cl]Cl (4) (MeOD- <i>d</i> ₄).....	104
Tabela 5.2.2.1. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento de [Au(H ₂ Ac ₄ DH)Cl]Cl·H ₂ O (1a) e [Au(H ₂ Bz ₄ Ph)Cl]Cl (4).....	107
Tabela 5.2.2.2. Comprimentos de ligação (Å) selecionados para [H ₂ Ac ₄ DH]Cl, [Au(H ₂ Ac ₄ DH)Cl]Cl·H ₂ O (1a), H ₂ Bz ₄ Ph e [Au(H ₂ Bz ₄ Ph)Cl]Cl (4).....	108
Tabela 5.2.2.3. Ângulos de ligação (°) selecionados para [H ₂ Ac ₄ DH]Cl, [Au(H ₂ Ac ₄ DH)Cl]Cl·H ₂ O (1a), H ₂ Bz ₄ Ph e [Au(H ₂ Bz ₄ Ph)Cl]Cl (4).....	108
Tabela 5.2.2.4. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para [Au(H ₂ Ac ₄ DH)Cl]Cl·H ₂ O (1a) e [Au(H ₂ Bz ₄ Ph)Cl]Cl (4).....	109
Tabela 5.2.3.1. Atividade citotóxica (IC ₅₀ , μmol L ⁻¹) contra células Jurkat, HL-60, MCF-7, HCT-116 e PBMC de tiossemicarbazonas, seus complexos (1-4) e auranofina.....	112
Tabela 6.1.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão, análise elementar, % de bismuto, massa molar (MM), condutividade molar dos complexos [Bi(H ₂ Gy ₃ DH)Cl ₃] (1), [Bi(H ₂ Gy ₃ Et)(OH) ₂ Cl] (2) e [Bi(H ₂ Gy ₃ Ph)Cl ₃] (3).....	120
Tabela 6.1.1.2. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das bis(tiossemicarbazonas) livres e de seus complexos [Bi(H ₂ Gy ₃ DH)Cl ₃] (1), [Bi(H ₂ Gy ₃ Et)(OH) ₂ Cl] (2) e [Bi(H ₂ Gy ₃ Ph)Cl ₃] (3)	122

Tabela 6.1.1.3. Atribuições (A), multiplicidade (M), número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (3) em comparação com as <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) ($\text{H}_2\text{L}_1\text{-H}_2\text{L}_3$) ($\text{DMSO-}d_6$).....	125
Tabela 6.1.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (D) de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (3) em comparação com as <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) ($\text{DMSO-}d_6$).....	126
Tabela 6.1.2.1. Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> das <i>bis</i> (tiossemicarbazonas), seus complexos de bismuto(III) $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (2), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (3), cloridrato de tetraciclina e ciprofloxacina.....	128
Tabela 6.2.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão, análise elementar, massa molar (MM) e condutividade molar dos complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (2) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3).....	131
Tabela 6.2.1.2. Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) e de $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (2) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3).....	132
Tabela 6.2.1.3. Atribuições (A), multiplicidade (M), número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H de $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (2) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3) em comparação com as <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) $\text{H}_2\text{L}_1\text{-H}_2\text{L}_3$ ($\text{DMSO-}d_6$).....	136
Tabela 6.2.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (D) de $\text{H}_2\text{Gy3Et}$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3) ($\text{DMSO-}d_6$).....	136
Tabela 6.2.1.5. Dados voltamétricos de <i>bis</i> (tiossemicarbazonas) e dos complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (2) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3).....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

H2Fo4Ph	<i>N</i> (4)-fenil 2-formilpiridina tiossemicarbazona
H2Bz4Ph	<i>N</i> (4)-fenil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4DH	2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4Me	<i>N</i> (4)-metil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4Ph	<i>N</i> (4)-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4oFPh	<i>N</i> (4)- <i>o</i> -fluorfenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4mFPh	<i>N</i> (4)- <i>m</i> -fluorfenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4pFPh	<i>N</i> (4)- <i>p</i> -fluorfenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4oClPh	<i>N</i> (4)- <i>o</i> -clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4mClPh	<i>N</i> (4)- <i>m</i> -clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4pClPh	<i>N</i> (4)- <i>p</i> -clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4oIPh	<i>N</i> (4)- <i>o</i> -iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4mIPh	<i>N</i> (4)- <i>m</i> -iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4pIPh	<i>N</i> (4)- <i>p</i> -iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4oNO ₂ Ph	<i>N</i> (4)- <i>o</i> -nitrofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4mNO ₂ Ph	<i>N</i> (4)- <i>m</i> -nitrofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4pNO ₂ Ph	<i>N</i> (4)- <i>p</i> -nitrofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4oT	<i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4mT	<i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H2Ac4pT	<i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona
H ₂ Gy3DH	Glioxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona)
H ₂ Gy3Me	<i>N</i> (3)-metil glioxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona)
H ₂ Gy3Et	<i>N</i> (3)-etil glioxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona)
H ₂ Gy3Ph	<i>N</i> (3)-fenil glioxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona)
M. M.	Massa molar
dec.	Decompõe
ε	Absortividade molar
calc	Calculado
TG	Análise termogravimétrica
Fc	Ferroceno

TBABF ₄	Tetrafluorborato de tetrabutílamônio
ENH	Eletrodo Normal de Hidrogênio
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
COSY	Correlation Spectroscopy
Hz	Hertz
MHz	MegaHertz
↑	Convenção no DEPT 135 para CH e CH ₃
↓	Convenção no DEPT 135 para CH ₂
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	4, 4-dimetilformamida
DMF- <i>d</i> ₇	4, 4-dimetilformamida deuterada
MeOH	Metanol
MeOD- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
Acetona- <i>d</i> ₆	Acetona deuterada
TMS	Tetrametilsilano
M	Multiplicidade
t	Tripleto
s	Simpleto
d	Dupleto
dd	dupleto duplo
td	tripleto duplo
q	Quarteto
m	Multipleto
α(N)-	cadeia lateral no C(2) do anel piridinico
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma de mama
GBM	Glioblastoma multiforme
T98G	Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano
U87	Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano

RT2	Linhagem de células de glioblastoma multiforme (rato)
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica aguda
Jurkat	Linhagem de células de leucemia de linfócitos T
HeLa	Linhagem de células de carcinoma cervical humano
HCT-116	Linhagem de células de carcinoma colorretal humano
PBMC	Linhagem de células mononucleares do sangue periférico humano
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
RPMI	Meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute”
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HPS	Solução fluorocrômica hipotônica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
PBS	Phosphate buffer solution
ADN	ácido desoxirribonucleico
RDR	Ribonucleosídeo difosfato redutase
TrxR	Tiorredoxina redutase (TrxR)
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
SAR	Structure-Activity Relationship
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
CIM	Concentração inibitória mínima
BHI	Infusão Cérebro Coração
ATCC	American Type Culture Collection
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução	1
1.1. QUÍMICA INORGÂNICA MEDICINAL.....	1
1.2. TIOSSEMICARBAZONAS E A QUÍMICA MEDICINAL.....	2
1.3. GÁLIO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS	5
1.4. OURO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS.....	6
1.5. BISMUTO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS.....	9
1.6. ANTIMÔNIO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS.....	9
1.7. BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E QUÍMICA MEDICINAL.....	10
1.8. FUNGOS PATOGÊNICOS E QUÍMICA MEDICINAL.....	11
1.9. DOENÇA DE CHAGAS E A QUÍMICA MEDICINAL.....	12
1.10. CÂNCER E QUÍMICA MEDICINAL.....	13
Câncer: definição e estatísticas.....	13
Classificação de agentes quimioterápicos usados para o tratamento de câncer.....	13
Tipos de morte celular.....	14
1.11. ESTUDOS TEÓRICOS EM QUÍMICA MEDICINAL.....	15
1.12. O PRESENTE TRABALHO: OBJETIVOS.....	16
Capítulo 2. Parte Experimental	17
2.1.EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS.....	17
Pesagens.....	17
Ponto de Fusão.....	17
Análise Elementar.....	17
Condutimetria.....	17
Termogravimetria (TG)	17
Espectroscopia de infravermelho (IV).....	18
Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)	18
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	18
Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.....	18
Voltametria cíclica.....	18
Estruturas cristalográficas.....	18
Reagentes.....	19

2.2. SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS, <i>BIS</i> (TIOSSEMICARBAZONAS) E COMPLEXOS METÁLICOS.....	19
Preparação do precursor 2-acetilpiridina hidrazona.....	19
Preparação de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -, <i>m</i> - e <i>p</i> -X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO ₂)	19
Síntese de complexos de gálio(III) com <i>N</i> (4)- <i>p</i> X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO ₂ , CH ₃)	20
Preparação de 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H ₂ Ac ₄ DH), seus derivados <i>N</i> (4)-metil- (H ₂ Ac ₄ Me) e <i>N</i> (4)-fenil- (H ₂ Ac ₄ Ph) substituídos, <i>N</i> (4)-fenil 2-formilpiridina tiossemicarbazona (H ₂ Fo ₄ Ph) e <i>N</i> (4)-fenil 2-benzoilpiridina (H ₂ Bz ₄ Ph) tiossemicarbazona.....	21
Síntese de complexos de antimônio(III) e bismuto(III) com <i>N</i> (4)-fenil 2-formilpiridina tiossemicarbazona (H ₂ Fo ₄ Ph) e <i>N</i> (4)-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H ₂ Ac ₄ Ph)	22
Síntese de complexos de ouro(I) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H ₂ Ac ₄ DH), seus derivados <i>N</i> (4)-metil (H ₂ Ac ₄ Me) e <i>N</i> (4)-fenil- (H ₂ Ac ₄ Ph) substituídos e com <i>N</i> (4)-fenil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H ₂ Bz ₄ Ph)	23
Preparação de glicoxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona) (H ₂ Gy ₃ DH) e seus derivados <i>N</i> (3)-metil- (H ₂ Gy ₃ Me), <i>N</i> (3)-etil- (H ₂ Gy ₃ Et) e <i>N</i> (3)-fenil- (H ₂ Gy ₃ Ph) substituídos.....	24
Síntese de complexos de bismuto(III) com glicoxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona) (H ₂ Gy ₃ DH) e seus derivados <i>N</i> (3)-etil- (H ₂ Gy ₃ Et) e <i>N</i> (3)-fenil- (H ₂ Gy ₃ Ph) substituídos.....	24
Síntese de complexos de complexos de ouro(I) e ouro(III) com glicoxaldeído <i>bis</i> (tiossemicarbazona) (H ₂ Gy ₃ DH) e seus derivados <i>N</i> (3)-metil- (H ₂ Gy ₃ Me) e <i>N</i> (3)-etil- (H ₂ Gy ₃ Et) substituídos.....	25
2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	26
Atividade antimicrobiana.....	26
Atividade citotóxica.....	27
Cálculos teóricos: estudo da relação estrutura-atividade (SAR)	31
Efeito sobre a polimerização da tubulina.....	32
Análise multiparamétrica para interrupção de mitose.....	32
Estudos de Interação com ADN plasmidial.....	33
Estudos de inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR).....	33

Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>in vitro</i>	34
Capítulo 3. <i>N(4)</i>-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus derivados <i>N(4)</i>- <i>o</i>-, <i>m</i>- e <i>p</i>-<i>X</i>-fenil-substituídos (<i>X</i> = <i>F</i>, <i>Cl</i>, <i>I</i>, <i>NO</i>₂): investigação do perfil farmacológico e estudos de mecanismo de ação citotóxica contra células de tumores sólidos.....	36
3.1. CARACTERIZAÇÃO DE <i>N(4)</i> -FENIL-2-ACETILPIRIDINA TIOSSEMICARBAZONA E SEUS DERIVADOS <i>N(4)</i> - <i>o</i> -, <i>m</i> - e <i>p</i> - <i>X</i> -FENIL (<i>X</i> = <i>Cl</i> , <i>F</i> , <i>I</i> , <i>NO</i> ₂)	37
Cores, temperaturas de fusão, massas molares e rendimentos.....	37
Espectros de Infravermelho.....	37
Espectros de ressonância magnética nuclear.....	38
3.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS.....	44
3.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS TIOSSEMICARBAZONAS 1-13.....	49
Atividade antimicrobiana.....	49
Atividade citotóxica.....	50
Cálculos teóricos: estudo da relação estrutura-atividade (SAR).....	53
Análise morfológica das células tumorais.....	57
Ensaio de coloração simultânea com brometo de etídio e laranja de acridina.....	58
Efeito sobre a polimerização da tubulina.....	59
Análise multiparamétrica para interrupção de mitose.....	60
Capítulo 4. Complexos de gálio(III) com <i>N(4)</i>-<i>pX</i>-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (<i>X</i> = <i>Cl</i>, <i>F</i>, <i>I</i>, <i>NO</i>₂, <i>CH</i>₃): atividade antimicrobiana e citotóxica contra células de tumores sólidos.....	62
4.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE GÁLIO(III) COM <i>N(4)</i> - <i>pX</i> -FENIL 2-ACETILPIRIDINA TIOSSEMICARBAZONAS (<i>X</i> = <i>Cl</i> , <i>F</i> , <i>I</i> , <i>NO</i> ₂ , <i>CH</i> ₃).....	63
Microanálises, massas molares, condutividade molar.....	63
Espectros de Infravermelho.....	64
Espectros de ressonância magnética nuclear.....	67
4.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS OBTIDAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL.....	71
4.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	75
Atividade antimicrobiana.....	75

Atividade citotóxica.....	76
Capítulo 5. Investigação do perfil farmacológico de complexos de antimônio(III), bismuto(III) e ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil-, 2-acetil- e 2-benzoilpiridina.....	78
5.1 Complexos de antimônio(III) e bismuto(III) com N(4)-fenil-2-formilpiridina tiossemicarbazona (H₂Fo₄Ph) e N(4)-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H₂Ac₄Ph).....	79
5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE ANTIMÔNIO(III) E BISMUTO(III)	79
Microanálises, massas molares e condutividade molar.....	80
Espectros de Infravermelho.....	80
Espectros de ressonância magnética nuclear	83
5.1.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS OBTIDAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL.....	84
5.1.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	93
Atividade antibacteriana.....	93
Atividade anti- <i>T. cruzi</i>	96
5.2 Complexos de ouro(I) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H₂Ac₄DH), seus derivados N(4)-metil- (H₂Ac₄Me) e N(4)-fenil- (H₂Ac₄Ph) substituídos e N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H₂Bz₄Ph).....	97
5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE OURO(I).....	97
Microanálises, massas molares e condutividade molar.....	98
Espectros de Infravermelho.....	100
Espectros de ressonância magnética nuclear	101
5.2.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS OBTIDAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL.....	105
5.2.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	109
Atividade citotóxica	109
Estudos de interação com ADN plasmidial	115
Inibição da atividade enzimática de tiorredoxina redutase (TrxR).....	115

Capítulo 6. Complexos de bismuto(III), ouro(I) e ouro(III) com glioxaldeído bis(tiossemicarbazonas): atividade antimicrobiana e citotoxicidade contra células tumorais	118
6.1. Complexos de bismuto(III) com glioxaldeído bis(tiossemicarbazona) (H_2Gy3DH) e seus derivados $N(3)$-etil (H_2Gy3Et) e $N(3)$-fenil (H_2Gy3Ph)	119
6.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE BISMUTO(III).....	119
Microanálises, condutividade molar e absorção atômica	120
Espectros de Infravermelho.....	121
Espectros de ressonância magnética nuclear	122
Espectros eletrônicos.....	126
6.1.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	128
Atividade antibacteriana	128
6.2. Complexos de ouro(III) e ouro(I) com glioxaldeído bis(tiossemicarbazona) (H_2Gy3DH) e seus derivados $N(3)$-metil (H_2Gy3Me) e $N(3)$-etil (H_2Gy3Et)	129
6.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE OURO(I) E OURO(III).....	129
Microanálises, massas molares e condutividade molar	130
Espectros de Infravermelho.....	131
Espectros de ressonância magnética nuclear	133
Espectros eletrônicos.....	137
Voltamogramas cíclicos.....	137
6.2.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	141
Atividade citotóxica	141
Inibição da atividade enzimática de tiorredoxina redutase (TrxR).....	143
Capítulo 7. Discussão e Conclusões	145
ANEXOS	153

1.1. QUÍMICA INORGÂNICA MEDICINAL

Durante muito tempo somente os compostos orgânicos eram considerados indispensáveis para a vida, enquanto que os elementos e compostos comumente chamados “inorgânicos” eram tidos como escassos ou com nenhum significado para os sistemas vivos¹. Cerca de 14 elementos inorgânicos, dentre eles alguns metais de transição, como manganês, ferro, cobalto, cobre e zinco, compõem um selecionado grupo de cerca de 24 elementos essenciais para plantas e animais². Esses metais desempenham funções cruciais, como transporte e ativação do oxigênio, transporte de elétrons, atuação em processos catalíticos e função estrutural¹.

Tanto os metais essenciais quanto os não-essenciais têm sido usados há cerca de 5000 anos no tratamento e prevenção de doenças³. Porém, foi nos últimos 100 anos que o uso medicinal de compostos inorgânicos foi desenvolvido de uma maneira racional, iniciando-se com o uso de $K[Au(CN)_2]$ para o tratamento de tuberculose e de compostos de antimônio para tratamento de leishmaniose. Na primeira década do século XX, Paul Ehrlich foi o primeiro a relacionar estrutura-atividade com o desenvolvimento de compostos de arsênio para o tratamento de sífilis⁴. Por essas e outras contribuições, Paul Ehrlich é considerado o pai da quimioterapia.

No entanto, a Química Inorgânica Medicinal se estabeleceu como disciplina somente com a descoberta, por Barnett Rosenberg e colaboradores, da atividade antitumoral da *cis*-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina) em 1965. A cisplatina, juntamente com o derivado de segunda geração *cis*-diaminociclobutano-1,1-dicarboxilato (carboplatina), constituem atualmente alguns dos principais compostos utilizados no tratamento de tumores⁵. Desde então é verificado crescente uso clínico de compostos que contêm metais para o diagnóstico e tratamento de doenças (ver Tabela 1.1)^{3,6}. Compostos de ouro, por exemplo, são usados no tratamento de artrite reumatóide, o nitroprussiato, $[Fe(II)(CN)_5(NO)]^{2-}$, é utilizado como vasodilatador, sais de bismuto são empregados no tratamento de úlcera, dentre outras aplicações.

¹ E.J. Baran, Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 7.

² L. Ronconi, P.J. Sadler, Coord. Chem. Rev. 252 (2008) 2239.

³ C.X. Zhang, S.J. Lippard, Curr. Opin. Chem. Biol. 7 (2003) 481.

⁴ C. Orvig, M.J. Abrams, Chem. Rev. 99 (1999) 2201.

⁵ T. Storr, K.H. Thompson, C. Orvig, Chem. Soc. Rev. 35 (2006) 534.

⁶ S.J. Berners-Price, P.J. Sadler, Coord. Chem. Rev. 151 (1996) 1.

Tabela 1.1. Fármacos e agentes de imagem à base de metais usados na clínica^{3,6}

Composto	Utilização
Cisplatina®	tratamento de tumores sólidos
Auranofina®	tratamento de artrite
citrato de bismuto(III)	tratamento de infecções causadas por <i>Helicobacter pylori</i>
nitroprussiato de sódio	agente hipotensivo (vasodilatador)
LiCO ₃	antipsicótico e antidepressivo
gluconato de antimônio(V) dissódico	tratamento de leishmaniose
[^{99m} Tc(I)(<i>terc</i> -butil metil éter)], Cardiolite	diagnóstico por radioimagem (coração)
citrato de ⁶⁷ gálio(III)	diagnóstico por radioimagem (tumores de tecidos moles e processos inflamatórios)

A ampla faixa de números de coordenação e de geometrias, os diversos estados redox possíveis, os efeitos termodinâmicos e cinéticos característicos e propriedades intrínsecas dos íons metálicos oferecem à Química Inorgânica Medicinal um amplo espectro de reatividades que pode ser explorado⁷.

Vale salientar que a atividade farmacológica dos compostos metálicos depende não apenas do íon metálico, como também do ligante. O desenvolvimento de ligantes que interagem com íons metálicos livres ou ligados a proteínas também tem sido um dos focos da pesquisa em Química Inorgânica Medicinal. Tais moléculas quando coordenadas ao íon metálico podem modificar suas propriedades físicas e químicas, como reatividade e lipofilicidade, e estabilizar determinados estados de oxidação⁵.

1.2. TIOSSEMICARBAZONAS E A QUÍMICA MEDICINAL

Tiossemicarbazonas são bases de Schiff que apresentam o esqueleto C=N-N-(C=S)-N em suas estruturas (Figura 1.1)⁸. Esses compostos geralmente são sintetizados empregando-se duas estratégias. Uma delas é a obtenção direta, pela condensação de aldeídos e/ou cetonas com tiossemicarbazidas. Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos. A outra estratégia consiste da obtenção indireta das tiossemicarbazonas, envolvendo a preparação prévia de tiossemicarbazidas ou hidrazonas utilizando hidrazina (NH₂-NH₂), seguida de condensação com o composto carbonilado específico, ou seguida de reação com isotiocianatos, ditiocarbamatos ou ácidos tiocarbamoiltioglicólicos⁹.

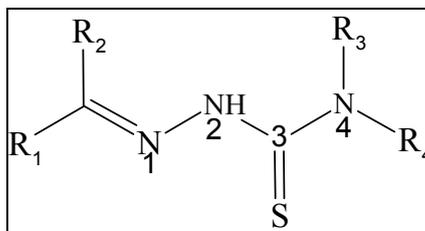


Figura 1.1. Estrutura genérica de tiossemicarbazonas.

⁷ P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, Curr. Opin. Chem. Biol. 12 (2008) 197.

⁸ H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem. 4 (2004) 159.

⁹ R.P. Tenório, A.J.S. Góes, J.G. Lima, A.R. Faria, A.J. Alves, T.M. de Aquino, Quim. Nova 28 (2005) 1030.

As tiossemicarbazonas podem coexistir nas formas tiona e tiol em equilíbrio tautomérico⁹. Esses compostos podem existir ainda na forma de dois isômeros configuracionais *Z* e *E* com relação à ligação C=N, dependendo da posição e da natureza do grupo substituinte. Tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas, como as substituídas na posição R1 por piridinas, também podem existir na forma do isômero *E'* (Figura 1.2), em que o enxofre e o nitrogênio imínico estão obrigatoriamente na posição *sin*¹⁰.

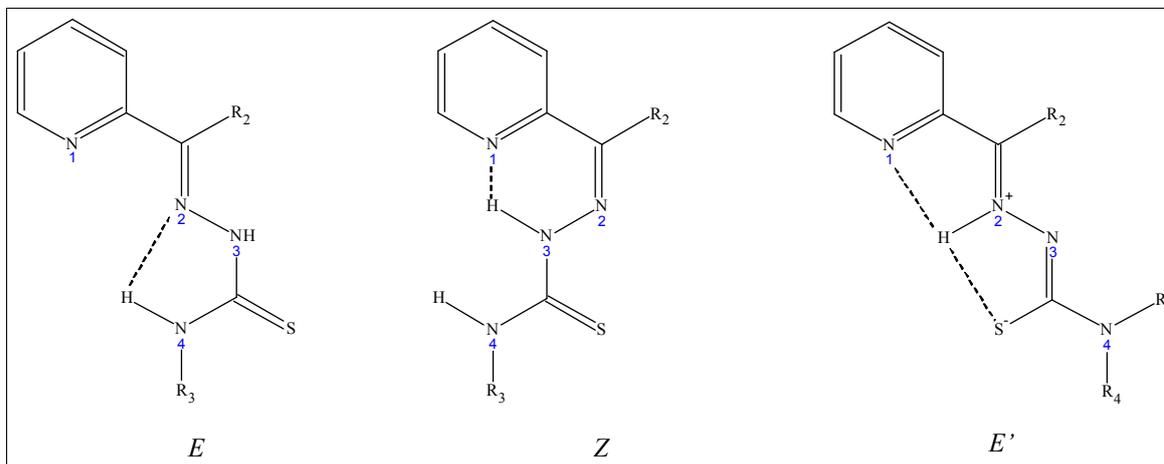


Figura 1.2. Isômeros *Z*, *E* e *E'* de tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -piridínicas.

As tiossemicarbazonas apresentam um amplo perfil farmacológico, atuando como agentes antitumorais, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos, dentre outros⁸. Em razão de suas propriedades farmacológicas e de sua capacidade quelante, as tiossemicarbazonas também têm sido extensivamente estudadas na Química Inorgânica Medicinal. Essas moléculas são versáteis, podendo coordenar-se a íons metálicos nas formas neutra ou aniônica, e de modo mono, bi ou tridentado. Estudos sugerem que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas nos sistemas biológicos está associado à coordenação dessas moléculas a metais *in vivo*. Além disso, a coordenação de tiossemicarbazonas a metais pode levar à obtenção de agentes farmacológicos mais potentes e à minimização de efeitos tóxicos¹¹.

A atividade antibacteriana é observada para uma ampla faixa de tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos. Entretanto, o único composto da família empregado na clínica é a tiacetazona (4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, Figura 1.3), usada no tratamento da tuberculose. O uso desse fármaco, no entanto, é limitado devido à sua ação predominantemente bacteriostática *in vivo*, ao rápido surgimento de cepas resistentes durante o tratamento e aos efeitos colaterais, como a indução de diabetes mellitus¹¹.

¹⁰ Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, J. Med. Chem. 52 (2009) 5271.

¹¹ H. Beraldo, Quim. Nova 27 (2004) 461.

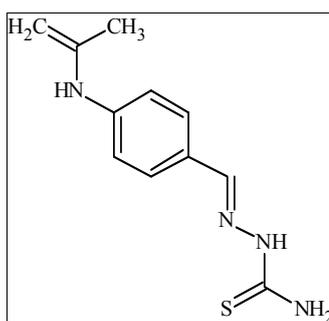


Figura 1.3. Estrutura de tiacetazona, usada no tratamento de tuberculose.

A atividade antitumoral de tiossemicarbazonas está relacionada principalmente à sua capacidade de inibir a ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), enzima que catalisa a redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, etapa crucial para a replicação e reparo do ácido desoxirribonucleico (ADN)¹⁰. Com a inativação da RDR, a síntese do ADN é interrompida e ocorre a consequente inibição da proliferação celular. Assim, a enzima é considerada um alvo estratégico para a terapia do câncer¹².

A RDR é uma enzima alostérica que consiste de duas sub-unidades, R1 e R2. Na sub-unidade R1 encontram-se o sítio catalítico, o sítio de especificidade e o sítio ativo, enquanto que a sub-unidade R2 contém dois íons ferro(III) ligados entre si por uma ponte μ -oxo e um radical livre tirosila (Figura 1.4)¹³.

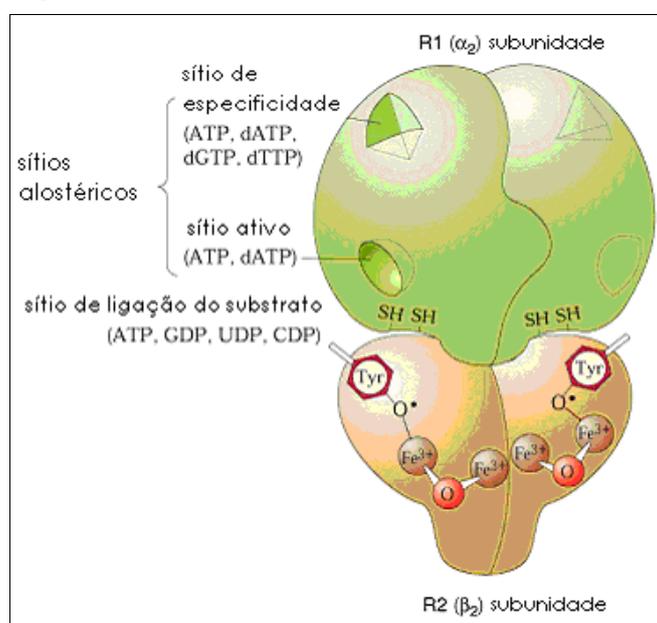


Figura 1.4. Representação esquemática da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR)¹⁴.

A hidroxiuréia é um inibidor da RDR (Figura 1.5a), o qual, no entanto, é um agente antitumoral de limitada eficácia, devido ao seu fraco efeito bloqueador da atividade da enzima

¹² J. Shao, B. Zhou, A.J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, Mol. Cancer Ther. 5 (2006) 586.

¹³ G. Nocentini, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 22 (1996) 89.

¹⁴ K.H. Thompson, C. Orvig, Science 300 (2003) 936.

e à sua curta meia-vida no plasma. Além disso, foi verificado o surgimento de células tumorais resistentes ao composto^{8,11}. A triapina (3-aminopiridina 2-carboxaldeído tiossemicarbazona) (Figura 1.5b) mostrou-se um inibidor da RDR e do crescimento de células tumorais 100-1000 vezes mais potente do que a hidroxiuréia, indicando tratar-se de um promissor candidato a fármaco¹². Recentemente foram apresentados os resultados de estudos clínicos fase II para a triapina¹⁵.

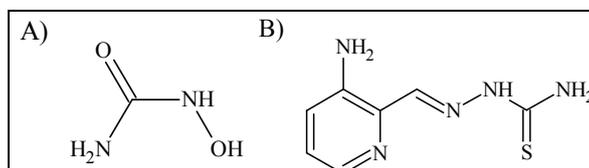


Figura 1.5. Estruturas dos inibidores da enzima RDR: A) hidroxiuréia e B) triapina.

As tiossemicarbazonas bloqueiam a ação da RDR através da destruição do radical livre tirosila. A ação inibitória foi associada à coordenação das tiossemicarbazonas aos íons ferro(III) da estrutura da enzima ou à inativação do radical livre tirosila da RDR por um elétron gerado pela oxidação do complexo de ferro(II) da tiossemicarbazona ao complexo de ferro(III). Nosso grupo propôs que o mecanismo de ação envolveria a oxidação do complexo de ferro(II) ao de ferro(III), com a liberação de um elétron que inativaria o radical livre da enzima, seguida da redução do complexo de ferro(III) ao de ferro(II) por um tiol celular¹⁶.

Bis(tiossemicarbazonas) (Figura 1.6) são agentes quelantes que também possuem propriedades biológicas importantes, entre as quais atividade citotóxica contra células tumorais e atividade antimicrobiana¹⁷. Devido a essas propriedades, houve grande interesse em complexar essas moléculas a metais, como cobre, zinco e níquel^{18,19,20}.

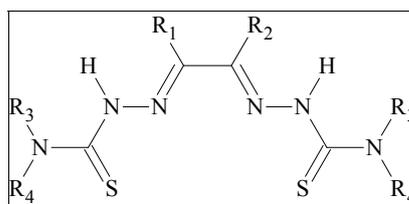


Figura 1.6. Estrutura genérica de *bis*(tiossemicarbazonas).

1.3. GÁLIO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS

O gálio foi descoberto em 1875 por Lecoq Boisbaudran²¹. O gálio trivalente é a forma iônica mais estável. Esse metal é empregado na clínica como agente terapêutico²² e de diagnóstico²³.

¹⁵ C.M. Nutting, C.M.L. van Herpen, A.B. Miah, S.A. Bhide, J.P. Machiels, J. Buter, C. Kelly, D. de Raucourt, K.J. Harrington. *Annals Oncol.* 20 (2009) 1275.

¹⁶ R.H.U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 65 (1997) 267.

¹⁷ A. Diaz, I. García, R. Cao, H. Beraldo, M.M. Salberg, D.X. West, L. González, E. Ochoa. *Polyhedron* 16 (1997) 3549.

¹⁸ D.X. West, J.S. Ives, G.A. Bain, A.E. Liberta, J. Valdés-Martínez, K.H. Ebert, S. Hernández-Ortega. *Polyhedron* 16 (1997) 1895.

¹⁹ H. Beraldo, S.B. Kaisner, J.D. Turner, I.S. Billeh, J.S. Ives, D.X. West. *Transition Met. Chem.* 22 (1997) 459.

²⁰ H. Beraldo, L.P. Boyd, D.X. West. *Transition Met. Chem.* 23 (1998) 67.

²¹ P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 42 (2002) 283.

^{67}Ga foi o primeiro radioisótopo a demonstrar nódulos linfáticos em pacientes com doença de Hodgkin e posteriormente foi descoberto seu acúmulo em tumores, tecidos de inflamação e ossos²⁴. Este radioisótopo é amplamente empregado no diagnóstico por radioimagem de linfoma²⁵.

As propriedades antitumorais do gálio tiveram seu estudo iniciado há apenas trinta anos e atualmente o gálio(III) é o segundo íon metálico, depois da platina, a ser usado no tratamento de câncer²⁶. O nitrato de gálio, por exemplo, é usado na clínica para o tratamento de hipercalemia relacionada ao câncer²⁷. Além disso, esse composto mostrou-se eficiente no tratamento de linfomas e de câncer de bexiga²⁸. Estudos sugerem que a atividade antitumoral do íon gálio é atribuída à sua capacidade de inibir a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR). A inativação envolveria a substituição de ferro(III) na sub-unidade R2 da enzima por gálio(III). Essa proposição é coerente, uma vez que o íon gálio(III) apresenta propriedades semelhantes às do íon ferro(III), como carga, diâmetro e número de coordenação, de forma que ambos os íons podem competir pelos mesmos alvos biológicos. O íon gálio(III), por exemplo, é transportado para o interior das células pela mesma proteína transportadora de ferro(III), a transferrina²².

A administração combinada de nitrato de gálio e hidroxiuréia, ambos conhecidos inibidores da RDR, produziu resposta em 43% dos pacientes com linfoma não-Hodgkin²⁹. Entretanto, a administração de sais de gálio, incluindo o nitrato de gálio, é limitada em função da toxicidade e da baixa absorção intestinal. Dessa forma, complexos de gálio têm sido sintetizados com o intuito de aumentar seu índice terapêutico. Muitos desses complexos apresentaram biodisponibilidade e eficácia antitumoral superior às do nitrato de gálio²⁴.

A atividade antimicrobiana de compostos de gálio também é conhecida^{22,22}. Recentemente foi relatado o aumento significativo da atividade de tiossemicarbazonas contra bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* com a complexação a gálio³⁰.

1.4. OURO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS

O uso de compostos de ouro na medicina tem sido relatado desde a Antiguidade, porém a base científica para a atividade farmacológica desse metal iniciou-se quando Robert Koch demonstrou efeitos bacteriostáticos de $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ ³¹. Atualmente, compostos de ouro são amplamente empregados na clínica para o tratamento de artrite reumatóide³².

²² L.R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 665.

²³ R. L. Hayes, *Semin. Nucl. Med.* 8 (1978) 183.

²⁴ M. Frezza, C.N. Verani, D. Chen, Q.P. Dou, *Letts. Drug Design Disc.* 4 (2007) 311.

²⁵ G.B. Hopkins, M. Kan, C.W. Mende, *J. Nucl. Med.* 16 (1975) 990.

²⁶ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1870.

²⁷ C.R. Chitambar, *Curr. Opin. Oncol.* 16 (2004) 547.

²⁸ M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Met. Ions. Biol. Sys.* 42 (2004) 425.

²⁹ C.R. Chitambar, S.A. Zahir, P.S. Ritch, T. Anderson, *Am. J. Clin. Oncol.* 20 (1997) 173.

³⁰ J.G. Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2305.

³¹ T.G. Benedek, *J. Hist. Med. Allied Sci.* 59 (2004) 50.

³² I. Ott, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1670.

O uso de ouro na medicina, especialmente no tratamento de artrite reumatóide, é chamado de crisoterapia. Compostos de ouro(I) como aurotioglicose (solganol), aurotiomalato (miocrisina), aurotiossulfato (sanocrisina), sulfonato de aurotiopropanol (alocrisina) e 1-tio- β -glucanopirranose 2,3,4,6-tetraacetato-S)ouro(I) trietilfosfina (auranofina, fármaco de segunda geração) são exemplos de fármacos anti-artríticos (Figura 1.7). Esses compostos atuam interrompendo ou retardando a progressão da doença^{31,33}.

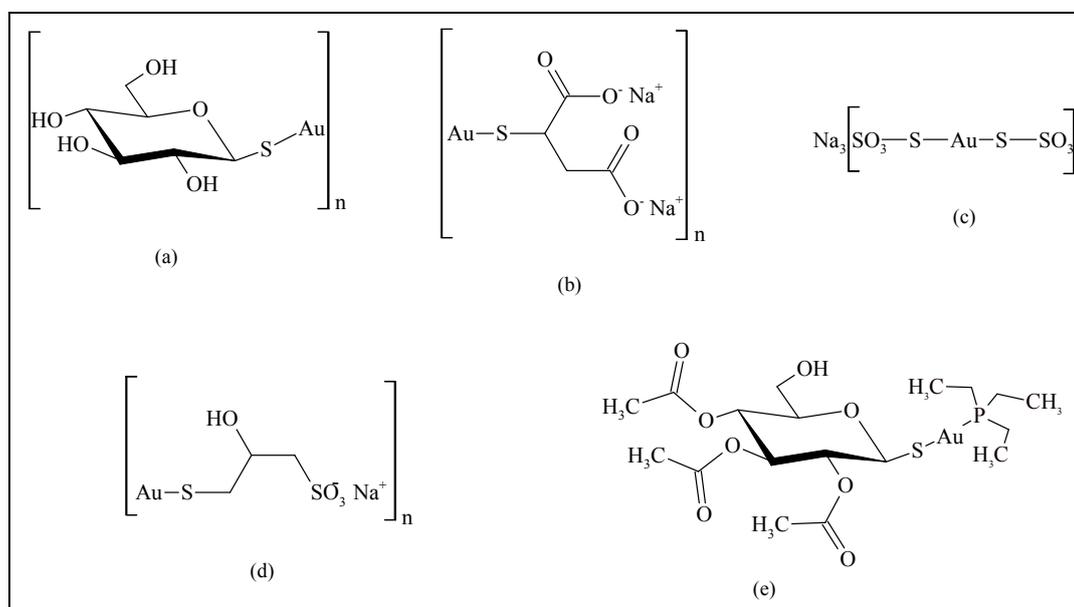


Figura 1.7. Compostos de ouro(I) usados na clínica para tratamento de artrite reumatóide: (a) solganol, (b) miocrisina, (c) sanocrisina, (d) alocricina e (e) auranofina.

Compostos de ouro(I), como a auranofina por exemplo, vêm despertando atenção por sua capacidade de inibir fortemente o crescimento de células tumorais^{32,33}. A atividade antiproliferativa de compostos de ouro deve-se principalmente à inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), a qual é relevante para a proliferação de tecidos tumorais³⁴.

A TrxR é uma flavoproteína homodimérica (Figura 1.8) que pertence à família das oxirredutases. A TrxR de mamíferos contém resíduo de selenocisteína no sítio ativo. Esta enzima catalisa a redução do dissulfeto do substrato tiorredoxina (Trx) a ditiol pelo NADPH. O ditiol, por sua vez, é um importante redutor celular, o qual está envolvido em reações como síntese enzimática de desoxirribonucleotídeos e defesa contra estresse oxidativo³⁵.

A literatura reporta complexos de ouro que apresentam atividade inibitória sobre TrxR, demonstrando a relevância desta enzima na farmacologia de compostos que contêm este metal. Estudos sugerem a ligação do íon metálico ao selênio presente no sítio ativo da TrxR como um dos possíveis mecanismos de inibição da enzima. A superexpressão de TrxR tem sido observada em várias linhagens de células tumorais. Além disso, elevados níveis do substrato

³³ E.R.T. Tiekink, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 225.

³⁴ M.P. Rigobello, L. Messori, G. Marcon, M.A. Cinellu, M. Bragadin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 1634.

³⁵ L. Zhong, E.S.J. Arnér, A. Holmgren, Biochem. 97 (2000) 5854.

tiorredoxina têm sido associados à resistência à cisplatina. Portanto, TrxR é um alvo interessante a ser considerado para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer³⁶.

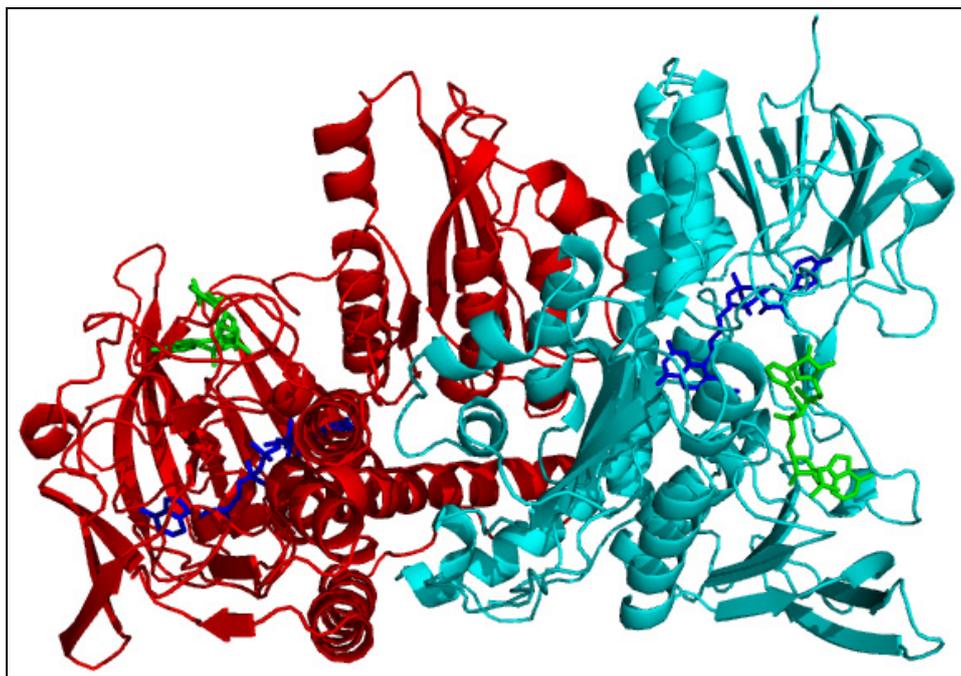


Figura 1.8. Representação da estrutura dimérica da enzima TrxR de mamíferos. As duas subunidades são mostradas nas cores azul claro e vermelho. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) estão presentes na estrutura cristalina de TrxR, sendo mostrados em verde e azul, respectivamente³⁷.

Devido a dificuldades nas aplicações farmacêuticas de compostos de ouro(III), o seu estudo foi abandonado até a década de 90, quando foi verificado o potencial antitumoral desses compostos³⁸. O íon ouro(III) é isoeletrônico de platina(II) e também forma complexos plano-quadráticos. Essas características tornam os compostos de ouro(III) interessantes para estudos biológicos, sobretudo em células tumorais³⁸. Nesse contexto, vale salientar que a inibição da TrxR tem sido relatada não apenas para complexos de ouro(I) como também para vários compostos de ouro(III)³².

Desde a recente descoberta das propriedades antitumorais de compostos de ouro(I) e ouro(III), diversos complexos desses íons têm sido sintetizados com diferentes tipos de ligantes, dentre os quais se destacam ligantes polidentados, porfirinas, ditiocarbamatos e tiossemicarbazonas³⁹. Ortner e Abram⁴⁰ relataram em 1998 os primeiros complexos de

³⁶ A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1692.

³⁷ Protein Data Bank, PDB ID: 2J3N, www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2J3N, acessado em 17 de dezembro de 2011.

³⁸ C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Gold Bulletin* 40 (2007) 73.

³⁹ A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1692.

⁴⁰ K. Ortner, U. Abram, *Inorg. Chem. Commun.* 1 (1998) 251.

ouro(III) com tiossemicarbazonas. O primeiro complexo de ouro(I) de tiossemicarbazona foi relatado em 2006 por Casas e colaboradores⁴¹.

Além do uso como fármacos anti-artríticos e do potencial de aplicação como agentes antitumorais, a literatura também relata outras atividades biológicas para os compostos de ouro. Por exemplo, auranofina e outros complexos de ouro apresentaram atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*⁴² e o fármaco solganol apresentou atividade inibitória *in vitro* contra o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)⁴³.

1.5. BISMUTO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS

O bismuto é o elemento estável mais pesado da tabela periódica. Os estados de oxidação mais comuns do metal são +3 e +5. Compostos de bismuto(III) apresentam número de coordenação variável (3-10) e geometria variada, enquanto que compostos de bismuto(V) geralmente são pentacoordenados^{44,45}.

Compostos de bismuto têm sido usados no tratamento de infecções microbianas, como sífilis, colite, no tratamento de feridas, malária, dispepsia, diarreia e úlceras pépticas⁴⁴. Três compostos de bismuto são amplamente usados no tratamento de distúrbios gastrointestinais: subssalicilato de bismuto (Pepto-Bismol®), subcitrato de bismuto coloidal (De-Nol®) e citrato de bismuto/ranitidina (RBC, Tritec® e Pylorid®).

Estudos farmacológicos sugerem que o tratamento e prevenção de úlceras pépticas por compostos de bismuto envolvem a proteção da mucosa gástrica, o estímulo de processos citoprotetores e a inibição do crescimento de *Helicobacter pylori*⁴⁶. Esta bactéria é a principal causadora de úlceras gástrica (60-70%) e duodenal (90-95%).

O radioisótopo ²¹³Bi é considerado um potencial agente radioterápico. Compostos desse radioisótopo têm sido usados como modelos pré-clínicos para o tratamento de leucemia e de câncer de próstata⁴⁵.

1.6. ANTIMÔNIO: PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS

Os estados de oxidação mais comuns do antimônio são +3 e +5. O composto tartarato de antimônio(III) e potássio ou tartarato emético foi muito utilizado para o tratamento de febre, pneumonia e em condições inflamatórias até a última década do século XIX⁴⁷. Após um breve período de desuso, o tartarato emético foi reintroduzido na medicina como o primeiro agente terapêutico eficaz no tratamento de leishmanioses. Desde então outros compostos de

⁴¹ J.S. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, J. Ellena, A. Sánchez, J. Sordo, C. Taboada, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1858.

⁴² M. Navarro, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1619.

⁴³ S.K. Hadjikakou, I.I. Ozturk, M.N. Xanthopoulou, P.C. Zachariadis, S. Zartilas, S. Karkabounas, N. Hadjiliadis, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 1007.

⁴⁴ P.J. Sadler, H. Li, H. Sun, Coord. Chem. Rev. 185/186 (1999) 689.

⁴⁵ N. Yang, H. Sun, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 2354.

⁴⁶ G.G. Briand, N. Burford, Chem. Rev. 99 (1999) 2601.

⁴⁷ J. Duffin, B.G. Campling, J. Hist. Med. Allied Sci. 57 (2002) 61.

antimônio(III) foram utilizados no tratamento da doença. Porém em função de efeitos colaterais, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotóxicos, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por complexos de antimônio pentavalentes⁴⁸. Foi proposto que o antimônio(V) agiria como um pró-fármaco, sendo reduzido no organismo do hospedeiro a antimônio(III), sua forma ativa e tóxica⁴⁷.

Brachamari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia esibamina. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio(V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentosan® (Glaxo Wellcome). Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França um medicamento alternativo, o antimoniato de N-metil-glucamina ou antimoniato de meglumina, comercializado como Glucantime® (Sanofi-Aventis)⁴⁹.

1.7. BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E QUÍMICA MEDICINAL

Até o início de século XX, eram comuns os relatos de mortes em função de infecções por bactérias patogênicas. As causas destas doenças eram pouco conhecidas e não havia tratamento efetivo. A descoberta e o desenvolvimento de agentes antibacterianos foi um dos grandes acontecimentos do século passado^{50, 51}.

Fármacos antibacterianos são compostos capazes de matar (agentes bactericidas) ou inibir o crescimento (agentes bacteriostáticos) de determinadas bactérias patogênicas com efeitos colaterais toleráveis sobre indivíduos ou animais tratados⁵². Atualmente existe uma grande variedade de fármacos antibacterianos, os quais são de origem sintética ou natural. Compostos naturais obtidos a partir de um microorganismo que manifesta uma relação de antibiose são chamados de antibióticos (por exemplo, as penicilinas)⁵³.

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados com base em seu mecanismo de ação: (a) inibidores da síntese da parede celular bacteriana: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina e bacitracina; (b) agentes que alteram a permeabilidade da membrana celular: daptomicina, polimixinas; (c) inibidores da síntese de proteínas: cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e aminoglicosídeos; (d) agentes antimetabólitos: trimetropim, sulfonamidas (bloqueiam enzimas essenciais no metabolismo do folato) (e) agentes que afetam o metabolismo bacteriano dos ácidos nucleicos: rifamicinas, quinolonas^{52, 54}.

Na Figura 1.9 são apresentadas as estruturas de alguns fármacos antibacterianos.

⁴⁸ S. Rath, L.A. Trivelin, T.R. Imbrunito, D.M. Tomazela, M.N. de Jesús, P.C. Marzal, H.F. Andrade Junior, A.G. Tempone, *Quim. Nova* 26 (2003) 550.

⁴⁹ C. Demicheli, F. Frézard, *Cadernos temáticos de Química Nova na Escola* 6 (2005) 24.

⁵⁰ M.V.N. de Souza, T.R.A. Vasconcelos, *Quim. Nova* 28 (2005) 678.

⁵¹ G.L. Patrick, *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford University Press, New York, 1995.

⁵² Goodman & Gilman, *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ª Ed., McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2005.

⁵³ P.G. Guilfoile, *Antibiotic-resistant bacteria*, Chelsea House Press, 2007.

⁵⁴ K.J. Simmons, I. Chopra, C.W.G. Fishwick, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 501.

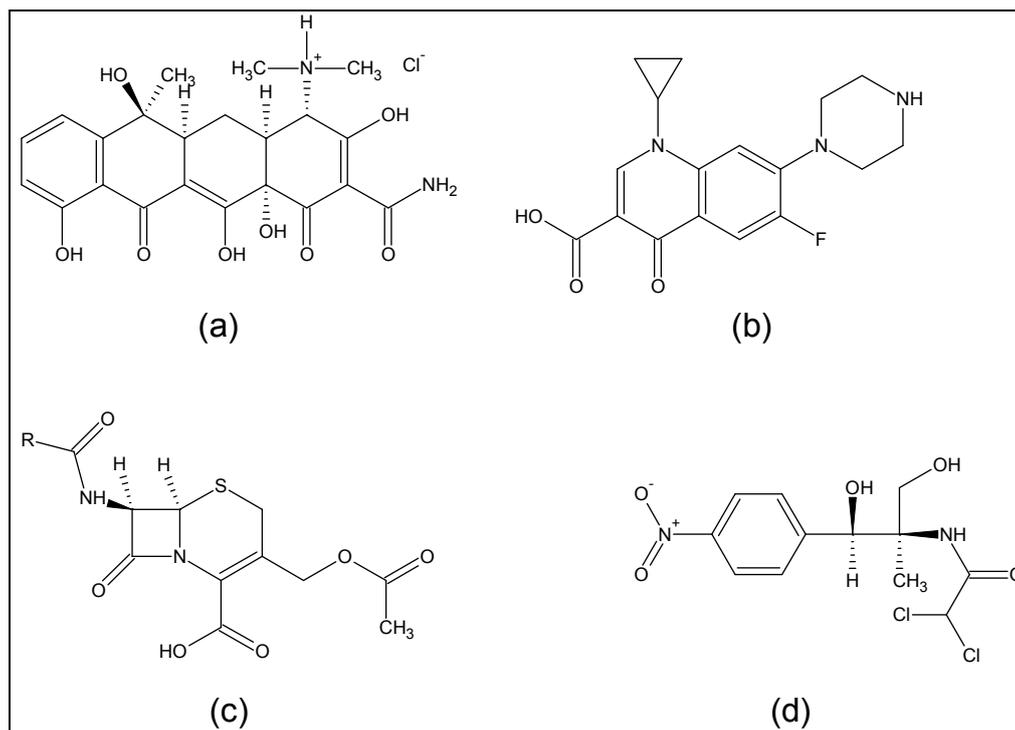


Figura 1.9. Exemplos de fármacos antimicrobianos: (a) cloridrato de tetraciclina, (b) ciprofloxacina, (c) cefalosporinas e (d) cloranfenicol.

As bactérias podem ser sensíveis ou resistentes aos fármacos antimicrobianos. A resistência pode ser natural ou adquirida. A resistência bacteriana adquirida resulta na redução da eficácia dos fármacos atualmente disponíveis na clínica⁵³. Assim, a busca por agentes antibacterianos que apresentem novos modos de ação é importante para se obter fármacos eficazes e, em alguns casos, mais específicos contra as bactérias patogênicas, bem como para contornar o problema gerado pelo desenvolvimento da resistência bacteriana⁵⁴.

1.8. FUNGOS PATOGENICOS E QUÍMICA MEDICINAL

Infecções fúngicas são causadas por fungos essencialmente patogênicos e por fungos oportunistas. Estes últimos são fungos de baixa virulência, que convivem pacificamente com o hospedeiro, mas que, ao encontrar condições favoráveis, como o baixo sistema imunológico do indivíduo, desenvolvem seu poder patogênico⁵⁵. A maioria das infecções fúngicas é causada por patógenos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*⁵⁶.

Fungos patogênicos e oportunistas podem invadir o organismo humano, causando micoses na pele e na mucosa (infecção fúngica superficial) ou micoses profundas de órgão internos (infecção fúngica sistêmica)⁵². O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. Nos últimos anos, a anfotericina B e os azóis - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol - têm sido os fármacos de primeira

⁵⁵ A.M. Bergold, S. Georgiadis, *Visão Acadêmica* 5 (2004) 159.

⁵⁶ J. Karkowska-Kuleta, M. Rapala-Kozik, A. Kozik, *Acta Biochim. Pol.* 56 (2009) 211.

escolha na terapia⁵⁵. Para o tratamento das micoses superficiais, há maior diversidade de fármacos disponíveis. Além de anfotericina B e de maior variedade de azóis (ex. clotrimazol, econazol, isoconazol, sertaconazol, miconazol, terconazol e tioconazol), podem ser citados os antifúngicos: nistatina, flucitozina, amorolfina, tolnaftato, terbinafina e griseofulvina^{52,55,57}). Na Figura 1.10 são apresentadas as estruturas de alguns fármacos antifúngicos.

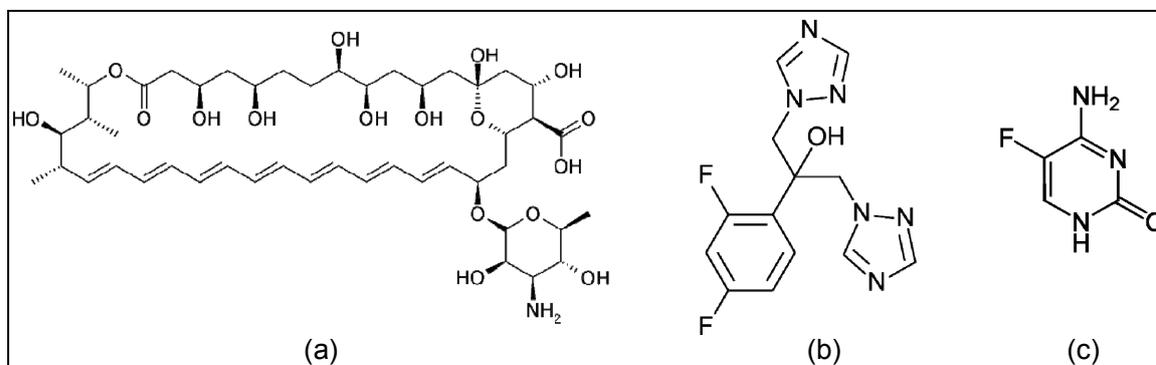


Figura 1.10. Exemplos de fármacos antifúngicos: (a) anfotericina B, (b) fluconazol e (c) flucitosina.

1.9. DOENÇA DE CHAGAS E A QUÍMICA MEDICINAL

A doença de Chagas, também chamada de tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Esta doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta cerca de 15 milhões de indivíduos, sendo que mais de 80 milhões de pessoas se encontram em área de risco^{58,59}. Insetos dos gêneros *Triatoma* são considerados os principais vetores da transmissão da doença de Chagas. Também há relatos da transmissão da doença por transfusão de sangue⁶⁰.

O parasita possui um complexo ciclo biológico e apresenta três formas distintas: (a) epimastigota, forma presente no vetor; (b) tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante; e (c) amastigota, forma de replicação intracelular. As duas últimas formas estão presentes no hospedeiro vertebrado⁶¹.

Nifurtimox (Lampit®) e benzonidazol (LAFEPE®) (Figura 1.11) são atualmente os dois únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas^{62,63}. No entanto, esses compostos causam efeitos colaterais significativos e apresentam baixa eficácia clínica, tornando necessário o desenvolvimento de fármacos alternativos para o tratamento da doença⁶². Proteases (ex. cruzipaina), biossíntese de esteróis e de lipídios são alguns exemplos de alvo macromolecular e de rotas metabólicas que vêm sendo estudados para o desenvolvimento de novos fármacos anti-chagásicos. As principais classes de inibidores da

⁵⁷ D.A. Williams, T.L. Lemke, Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5^a ed., Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002.

⁵⁸ W. de Souza, T.M.U. de Carvalho, E.S. Barrias, Int. J. Cell Biol. (2010) 1.

⁵⁹ J.R. Coura, J.C.P. Dias, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 104 (2009) 31.

⁶⁰ A. Moncayo, A.C. Silveira, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 104 (2009) 17.

⁶¹ L.C. Dias, M.A. Dessoay, J.J.N. Silva, O.H. Thiemann, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Quim. Nova 32 (2009) 2444.

⁶² D.S. Ferreira, V.R. Esperandim, M.P.A. Toldo, J. Saraiva, W.R. Cunha, S. Albuquerque, Parasitol. Res. 106 (2010) 985.

⁶³ J.H. McKerrow, P.S. Doyle, J.C. Engel, L.M. Podust, S.A. Robertson, R. Ferreira, T. Saxton, M. Arkin, I.D. Kerr, L.S. Brinen, C.S. Craik, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (2009) 263.

cruzipaína incluem: (a) derivados peptídicos; (b) derivados não-peptídicos (triazóis, pirimidinas, tiossemicarbazonas e chalconas); (c) complexos de rênio e ouro e (d) complexos de ferro e rutênio doadores de óxido nítrico⁶¹.

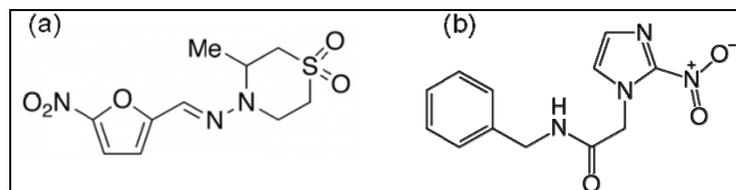


Figura 1.11. Estruturas dos fármacos anti-chagásicos (a) nifurtimox e (b) benznidazol.

1.10. CÂNCER E QUÍMICA MEDICINAL

Câncer: definição e estatísticas

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum a multiplicação desordenada de células que invadem tecidos e órgãos adjacentes. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, ocasionando na formação de tumores ou neoplasias malignas. Essas células também podem se espalhar para outras regiões através de um processo conhecido como metástase^{64,65}.

O câncer é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda maior causa em países em desenvolvimento. Estima-se que em 2008 surgiram 12,7 milhões de novos casos de câncer no mundo. A sobrevivência à doença tende a ser menor em países em desenvolvimento, principalmente em razão do diagnóstico tardio e do acesso limitado ao tratamento adequado⁶⁶.

Classificação de agentes quimioterápicos usados para o tratamento de câncer

A radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia constituem os três principais tipos de tratamento do câncer⁶⁷. O uso de agentes quimioterápicos permite o realizar o tratamento de doenças que não são acessíveis aos procedimentos de terapia localizados. Devido à variedade de quimioterápicos antineoplásicos existentes, é inviável classificá-los em função de suas funções químicas. Calabresi e Chabner propuseram uma classificação desses fármacos com base em seus mecanismos e locais de ação: agentes alquilantes, antimetabólicos, antagonistas purínicos, enzimas, derivados da platina, inibidores de mitose e outros^{68,69}.

Os quimioterápicos também podem ser classificados quanto à interferência no ciclo celular. São denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS) os quimioterápicos que exercem sua ação durante uma fase específica do ciclo celular. Um segundo grupo de agentes,

⁶⁴ C. Avendaño, J. C. Menéndez, Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier B.V., Oxford, 2008.

⁶⁵ A.P.S. Fontes, E.T. César, H. Beraldo, Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 13.

⁶⁶ A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, CA Cancer J. Clin. 61 (2011) 69.

⁶⁷ L. Lyons, The biology of cancer: Diagnosis and treatment of cancer, Chelsea House, Nova Iorque, 2007.

⁶⁸ E. Espinosa, P. Zamora, J. Feliu, M. González Barón, Cancer Treat. Rev. 29 (2003) 515.

⁶⁹ V.L. de Almeida, A. Leitão, L.C.B. Reina, C.A. Montanari, C.L. Donnici, M.T.P. Lopes, Quim. Nova 28(2005) 118.

denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), atua contra células tumorais independentemente da fase do ciclo que estas se encontram^{52,69} (Figura 1.12).

O ciclo celular pode ser descrito da seguinte maneira: (a) existe uma fase pré-sintética (G_1); (b) ocorre a síntese de ADN (fase S); (c) segue um intervalo após o término da síntese de ADN (fase pós-sintética, G_2); e (d) ocorre a mitose (M). Durante a mitose a célula contendo o conteúdo de ADN duplicado divide-se em duas células que reentram imediatamente no ciclo celular ou passam por uma fase não-proliferativa, designada G_0 (Figura 1.12)^{52,70}.

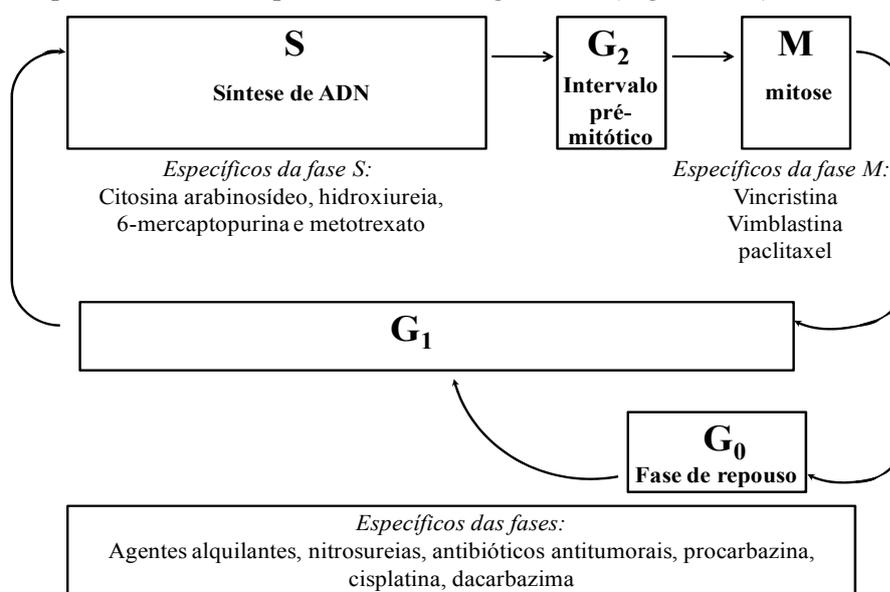


Figura 1.12. O ciclo celular e exemplos de quimioterápicos que atuam em fases específicas e inespecíficas do ciclo⁵².

Os alcalóides da vinca (ex. vimblastina e vincristina) e colchicina são exemplos de quimioterápicos (CCS) que bloqueiam as células em mitose. Esses fármacos ligam-se especificamente à tubulina e bloqueiam a capacidade dessa proteína de polimerizar-se em microtúbulos⁷¹. Os microtúbulos são estruturas tubulares rígidas que formam os fusos mitóticos, os quais têm como função separar os cromossomos durante a mitose⁷². Com a exposição de células a agentes anti-mitóticos, ocorre a ruptura dos microtúbulos e a divisão celular é interrompida. Na ausência de um fuso mitótico intacto, os cromossomos podem dispersar-se pelo citoplasma ou aglomerar-se. A incapacidade de separação correta dos cromossomos durante a mitose leva à morte celular⁵².

Tipos de morte celular

Uma célula é considerada morta quando está inserida em um dos seguintes critérios moleculares ou morfológicos: (a) a célula perdeu a integridade de sua membrana plasmática; (b) a célula, incluindo seu núcleo, sofreu completa fragmentação em corpos discretos,

⁷⁰ B.G. Katzung, Farmacologia básica & clínica, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1998.

⁷¹ M. A. Jordan, L. Wilson, Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 253.

⁷² R. Heald, E. Nogales, J. Cell Science 115 (2002) 3.

geralmente chamados de corpos apoptóticos; (c) ou seus fragmentos foram incorporados por uma célula adjacente. De acordo com critérios morfológicos, a morte celular pode ser dividida em quatro modalidades: apoptose, necrose, autofagia e cornificação (Tabela 1.2)⁷³.

Tabela 1.2. Modalidades de morte celular e características morfológicas relacionadas⁷³

Morte celular	Características morfológicas celulares
Apoptose	(a) Forma arredondada; (b) Redução de volumes celular e nuclear; (c) Fragmentação nuclear; (d) Modificações mínimas nas organelas citoplasmáticas; (e) Formação de bolhas de citoplasma a partir da membrana plasmática que se desprendem e formam corpos apoptóticos; (f) Ingestão por fagócitos <i>in vivo</i> .
Autofagia	(a) Ausência da condensação da cromatina; (b) Massiva formação de vacúolos autofágicos; (d) Pequena ou nenhuma ingestão por fagócitos <i>in vivo</i> .
Cornificação	(a) Eliminação de organelas citoplasmáticas; (b) Modificação da membrana citoplasmática; (c) Acúmulo de lipídios; (d) Extrusão de lipídios para o espaço extracelular; (e) Descamação por ativação de protease.
Necrose	(a) Inchaço citoplasmático; (b) Ruptura da membrana citoplasmática; (c) Inchaço de organelas citoplasmáticas; (d) Moderada condensação da cromatina.

1.11. ESTUDOS TEÓRICOS EM QUÍMICA MEDICINAL

A aplicação de modelos teóricos para representar a estrutura molecular, estudar reações químicas e estabelecer relações entre a estrutura e propriedades ou atividades biológicas da matéria constituem o domínio de atuação da modelagem molecular⁷⁴. Em Química Medicinal, o termo “relação estrutura-atividade” compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto pode causar durante sua interação com o receptor biológico e a racionalização dos principais fatores que governam esta interação^{75,76}.

Para descrever os tipos de interações entre um ligante e o seu receptor biológico pode-se utilizar um conjunto extenso de propriedades moleculares ou descritores. Os descritores moleculares representam uma importante ferramenta para prever as propriedades das substâncias, classificar estruturas químicas ou procurar similaridades entre elas⁷⁶. Os descritores moleculares podem ser obtidos por modelagem da estrutura molecular através de métodos computacionais. Programas foram e vem sendo desenvolvidos para calcular a estrutura de moléculas com um compromisso adequado entre velocidade e precisão e para fornecer recursos de computação gráfica⁷⁷.

⁷³ G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3.

⁷⁴ H.F. dos Santos, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* (2001) 4.

⁷⁵ C.M. R. Sant’Anna, *Rev. Virtual Quim.* 1(2009) 49.

⁷⁶ A. Arroio, K.M. Honório, A.B.F. da Silva, *Quim. Nova* 33 (2010) 694.

⁷⁷ E.J. Barreiro, C.R. Rodrigues, M.G. Albuquerque, C.M.R. de Sant’Anna, R.B. de Alencastro, *Quim. Nova* 20 (1997) 1.

1.12. O PRESENTE TRABALHO: OBJETIVOS

O presente trabalho consistiu na investigação do perfil farmacológico de famílias de tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas, *bis*(tiossemicarbazonas) e seus complexos metálicos, na busca por novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais e antimicrobianos.

Como mencionamos, a inibição da RDR, é considerada um dos principais alvos de ação das tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas. Gálio(III), por suas similaridades químicas com ferro(III), poderia substituir o ferro na estrutura da enzima, com a conseqüente inativação de sua atividade catalítica. Assim, complexos de gálio(III) de tiossemicarbazonas reuniriam, em um mesmo composto, ambos o metal e o ligante com mecanismo de ação via inibição de RDR.

Foi também mencionado que TrxR é uma enzima que está envolvida no mesmo ciclo de reações redox do qual a RDR faz parte, e que converte ribonucleotídeos nas formas desoxi correspondentes durante a síntese do ADN. Sabe-se que compostos de ouro(I) agem como inibidores de TrxR e que essa inibição seria parte de seus mecanismos de ação antitumoral.

Desse modo, no planejamento de agentes citotóxicos contra células tumorais a partir de tiossemicarbazonas, os íons metálicos de escolha foram gálio(III) e ouro(I). Nos complexos desses metais ambos o ligante e o metal teriam atividade intrínseca. Tiossemicarbazona e gálio(III) teriam como alvo a RDR, enquanto o alvo de ouro(I) seria a TrxR. Em todos os casos a interferência com a biossíntese do ADN seria o mecanismo final.

Considerando-se que a resistência aos antibióticos em uso clínico consiste em um dos grandes problemas de saúde humana e animal nos dias de hoje, e tendo-se em conta a atividade antibacteriana de compostos de bismuto, complexos de tiossemicarbazonas e *bis*(tiossemicarbazonas) com bismuto(III) foram obtidos e avaliados quanto à sua ação antibacteriana e antifúngica, na busca por novos agentes antimicrobianos.

Como dissemos, compostos antimoniais são empregados contra leishmanioses, mas apresentam efeitos colaterais indesejáveis, sendo necessária a busca por alternativas terapêuticas. Uma vez que *Trypanosoma cruzi*, apresenta similaridades bioquímicas com *Leishmania*, compostos de antimônio poderiam também ser úteis como agentes antichagásicos. Além disso, a literatura relata que compostos de antimônio mostram atividade contra diferentes microorganismos, e portanto apresentam potencial como novos candidatos a fármacos antimicrobianos. Sendo assim, complexos de antimônio(III) com tiossemicarbazonas foram preparados e seu perfil farmacológico foi investigado.

Acreditamos que os compostos aqui estudados possam constituir modelos interessantes na busca de novos candidatos a protótipos de fármacos.

2.1. EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS

Pesagens

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

Ponto de Fusão

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

Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas no Departamento de Química da UFMG e no Instituto de Química da USP (Central Analítica), utilizando-se o equipamento C,H,N – 2400 Perkin Elmer (precisão 0,01%).

Condutimetria

As medidas de condutividade molar dos complexos foram feitas a partir de uma solução de concentração $\sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos compostos em dimetilformamida (DMF) ou metanol. Para tal foi utilizado um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica de constante $0,088 \text{ cm}^{-1}$. A classificação do tipo de eletrólito foi feita com base na tabela abaixo.

Tabela 2.1. Tipo de eletrólito¹ para soluções $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em dimetilformamida ou metanol

Tipo de eletrólito para soluções $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($\Lambda_M = \text{ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)			
Solvente	1:1	2:1	3:1
Dimetilformamida	65-90	130-170	200-240
Metanol	80-115	160-220	290-350?

Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em atmosfera de nitrogênio com razão de aquecimento de 10 ou 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura de 25-990 $^{\circ}\text{C}$. Foi utilizada uma Termobalança Mettler TA-4000 com analisador TG50 do Departamento de Química da UFMG.

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

Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram registrados nas regiões 4000-370 cm^{-1} e 710-180 cm^{-1} , utilizando-se o espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX e empregando-se pastilhas de KBr ou emulsões de nujol em placas de CsI.

Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos foram registrados utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e soluções dos compostos ($\sim 10^{-4}$ a 10^{-7} mol L^{-1}) em DMF. Foi utilizado o espectrofotômetro HP8453 diode array – Hewlett Packard.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY e/ou HMQC foram obtidos no espectrômetro Bruker DPX-200 (200 MHz) usando-se DMSO- d_6 , DMF- d_7 , MeOD- d_4 ou acetona- d_6 como solventes e tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

Foram feitas dosagens de bismuto de amostras previamente digeridas com ácido nítrico concentrado em espectrômetro modelo Hitachi-Z8200 acoplado a um forno de grafite Hitachi.

Voltametria cíclica

Estudos eletroquímicos foram realizados sob atmosfera de argônio à temperatura ambiente em um Potenciostato EcoChemie μ Autolab. Foram preparadas soluções dos compostos ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) em DMF contendo o eletrólito suporte tetrafluorborato de tetrabutilamônio (TBABF₄, 0,1 mol L^{-1}). A célula eletroquímica foi composta dos três eletrodos: carbono vítreo (eletrodo de trabalho), fio de platina (eletrodo auxiliar) e Ag/AgCl imerso em ponte salina contendo LiCl em etanol (eletrodo de referência).

Voltamogramas cíclicos foram obtidos na faixa de potencial 1,700 a -2,000 V e na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . O par redox Fc/Fc⁺ (Fc = ferroceno, 0,400 V vs Eletrodo Normal de Hidrogênio, ENH) foi utilizado como padrão interno para conversão do potencial medido em volts *versus* Ag/AgCl para volts *versus* ENH.

Estruturas cristalográficas

As estruturas foram determinadas em colaboração com os pesquisadores Prof. Dr. Nivaldo Speziali (Departamento de Física, UFMG) e Dra. Isolda Maria de Castro Mendes (Escola de Belas Artes, UFMG) e por Jeferson Gomes da Silva (doutorando em Química-UFMG). As medidas foram realizadas a temperatura ambiente no difratômetro Oxford GEMINI. Detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritas nos capítulos.

Reagentes

As procedências dos reagentes foram: tiossemicarbazidas (Merck e Aldrich), aldeídos e cetonas (glioaldeído, 2-benzoilpiridina, 2-acetilpiridina, 2-piridincarboxaldeído) (Fluka e Aldrich), hidrazina monoidratada (Aldrich), isotiocianatos (*o*-, *m*-, *p*- Cl, F, I e NO₂) (Aldrich e Alfa Aesar), cloreto de antimônio (Aldrich), cloreto de bismuto (Aldrich), tetracloroaurato(III) de hidrogênio triidratado (Aldrich), nitrato de gálio (III) (Aldrich), trifluoreto de boro (Fluka), H₂SO₄ concentrado (Synth), metanol (Synth), etanol (Synth), éter etílico (Grupo Química), diclorometano (Synth), acetona (Quimex), DMF (Synth e Merck), DMSO (Synth). Os solventes foram utilizados sem destilação prévia.

2.2. SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS, BIS(TIOSSEMICARBAZONAS) E COMPLEXOS METÁLICOS

Preparação do precursor 2-acetilpiridina hidrazona

Em um balão de fundo redondo contendo 100,0 mmol de 2-acetilpiridina em 40,0 mL de etanol sob banho de gelo, foi adicionado excesso de 30% de hidrazina monoidratada. A mistura ficou submetida a agitação por 48 h, e em seguida o meio reacional foi levado ao congelador por 1 dia. Formou-se um sólido branco (2-acetilpiridina hidrazona), o qual foi filtrado em papel de filtro sob vácuo e lavado com etanol gelado e com éter etílico. O produto foi seco ao ar. A hidrazona foi caracterizada por RMN de ¹H para identificação e verificação de pureza. Este precursor foi utilizado na preparação de *N*(4)- *o*-, *m*- e *p*-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO₂).

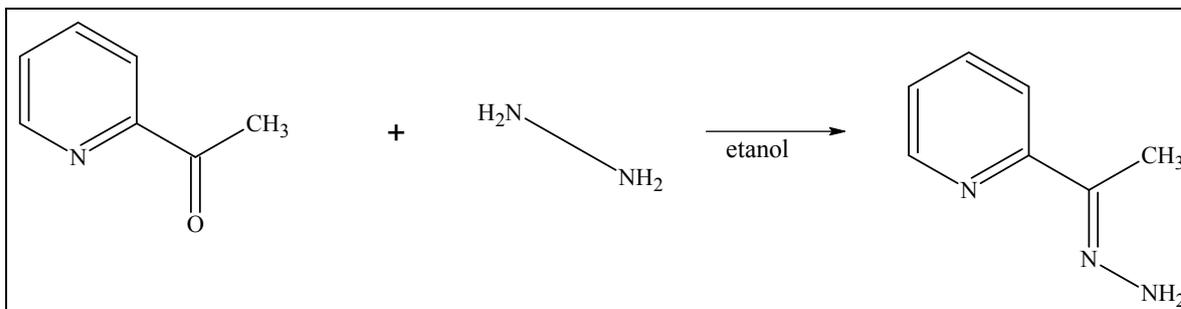


Figura 2.1. Esquema de síntese de 2-acetilpiridina hidrazona.

Preparação de *N*(4)- *o*-, *m*- e *p*-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO₂)

Foram preparadas: *N*(4)-*o*-fluorfenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*o*FPh), *N*(4)-*m*-fluorfenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*m*FPh), *N*(4)-*p*-fluorfenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*p*FPh), *N*(4)-*o*-clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*o*ClPh), *N*(4)-*m*-clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*m*ClPh), *N*(4)-*p*-clorofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*p*ClPh), *N*(4)-*o*-

iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*o*IPh), *N*(4)-*m*-iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*m*IPh), *N*(4)-*p*-iodofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*p*IPh), *N*(4)-*o*-nitrofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*o*NO₂Ph), *N*(4)-*m*-nitrofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*m*NO₂Ph) e *N*(4)-*p*-nitrofenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*p*NO₂Ph). As tiossemicarbazonas que contêm o substituinte iodo são inéditas.

Em um balão de fundo redondo contendo 10,0 mmol de 2-acetilpiridina hidrazona em 30 mL de etanol foi adicionada quantidade equimolar de *o*-, *m*- ou *p*-X-fenil isotiocianato (X = F, Cl, I, NO₂). A mistura foi submetida a agitação por 24 h. Ao fim desse tempo, o sólido obtido foi filtrado em papel de filtro sob vácuo, lavado com etanol e em seguida com éter etílico. O produto foi seco ao ar.

As tiossemicarbazonas foram caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC e difração de raios X de monocristal.

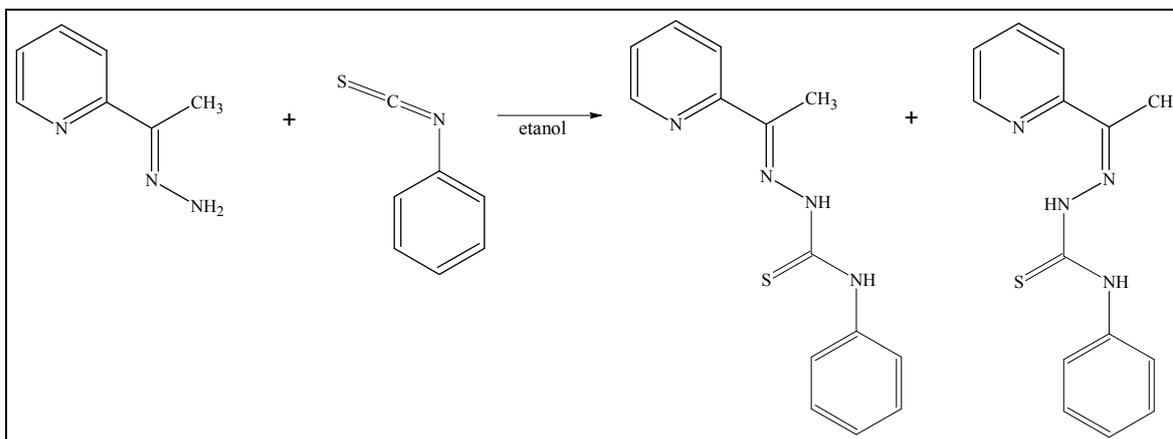


Figura 2.2. Esquema de síntese de *N*(4)- *o*-, *m*- e *p*-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO₂).

Síntese de complexos de gálio(III) com *N*(4)-*p*-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO₂, CH₃)

Foram sintetizados cinco complexos de gálio(III) com H2Ac4*p*FPh, H2Ac4*p*ClPh, H2Ac4*p*IPh, H2Ac4*p*NO₂Ph e *N*(4)-*para*-toluolil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4*p*T): [Ga(2Ac4*p*FPh)₂]₂NO₃, [Ga(2Ac4*p*ClPh)₂]₂NO₃, [Ga(2Ac4*p*IPh)₂]₂NO₃, [Ga(2Ac4*p*NO₂Ph)₂]₂NO₃·3H₂O e [Ga(2Ac4*p*T)₂]₂NO₃. O método de síntese é descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo contendo 3,0 mmol da tiossemicarbazona desejada em 10,0 mL de metanol sob agitação, foi adicionado 1,5 mmol de nitrato de gálio previamente solubilizado em 5,0 mL de metanol. A mistura foi submetida a refluxo por 7 h e permaneceu sob agitação por 24 h. Ao fim desse tempo, a mistura foi filtrada em papel de filtro sob vácuo, lavada com metanol e em seguida com éter etílico. O sólido obtido foi seco em estufa.

Os complexos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, espectroscopia de infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY e HMQC e difração de raios X de monocristal.

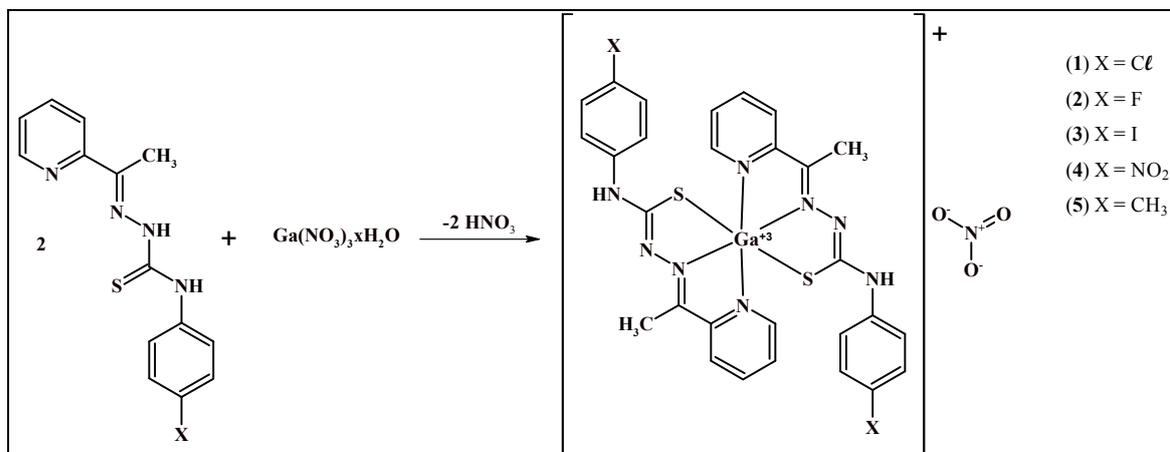


Figura 2.3. Esquema de síntese complexos de gálio(III) com *N*(4)-*p*X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, Cl, I, NO₂, CH₃).

Preparação de 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4DH), seus derivados *N*(4)-metil- (H2Ac4Me) e *N*(4)-fenil- (H2Ac4Ph) substituídos, *N*(4)-fenil 2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4Ph) e *N*(4)-fenil 2-benzoilpiridina (H2Bz4Ph) tiossemicarbazona

As tiossemicarbazonas H2Ac4DH, H2Ac4Me, H2Ac4Ph e H2Fo4Ph foram obtidas de acordo com o seguinte procedimento: em um balão de fundo redondo contendo 5,0 mmol da tiossemicarbazida desejada em 20 mL de etanol, foi adicionada quantidade equimolar de aldeído ou cetona correspondente. A mistura foi submetida a refluxo por 7 h e permaneceu sob agitação por 24 h. O sólido obtido foi filtrado em papel de filtro sob vácuo e lavado com etanol e em seguida com éter etílico.

A tiossemicarbazona H2Bz4Ph foi obtida de acordo com método descrito na literatura^{2,3}. Assim, em um balão de fundo redondo contendo 5,0 mmol de 2-benzoilpiridina em 25,0 mL de diclorometano, foram adicionados 5,0 mmol de BF₃. Após 10 min, foram acrescentados 5,0 mmol de 4-fenil-3-tiossemicarbazida. A mistura reacional permaneceu sob refluxo por 6 h, sendo em seguida adicionada solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase aquosa foi descartada e a fase em diclorometano foi concentrada. O precipitado formado foi filtrado, lavado com diclorometano e éter etílico, depois seco em estufa.

² A.E. Graminha, C. Rodrigues, A.A. Batista, L.R. Teixeira, E.S. Fagundes, H. Beraldo, Spectrochim. Acta Part A 69 (2008) 1073.

³ A.P. Rebolledo, G.M. Lima, N.L. Speziali, O.E. Piro, E.E. Castellano, J.D. Ardisson, H. Beraldo, J. Organometall. Chem. 691 (2006) 3919.

As tiossemicarbazonas foram caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia de IV, e RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e DEPT.

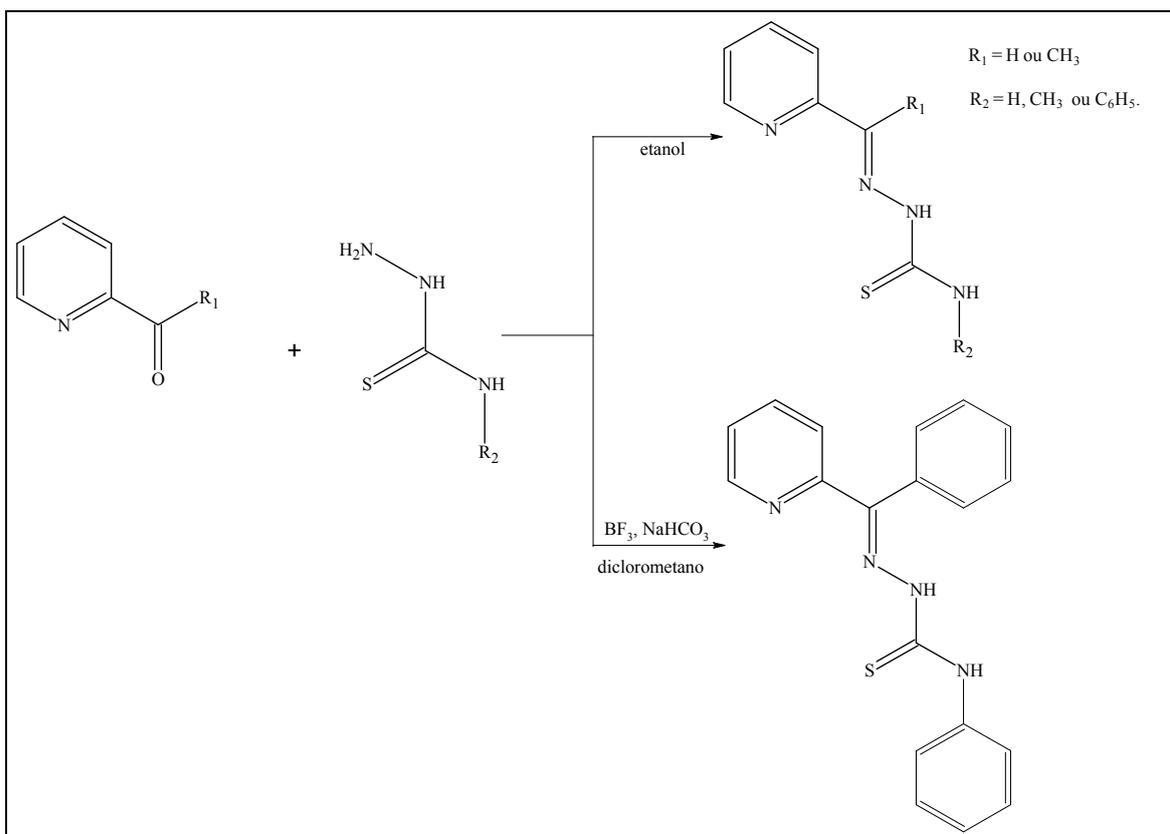


Figura 2.4. Esquemas de síntese de A) H2Ac4DH, H2Ac4Me, H2Ac4Ph, H2Fo4Ph e B) H2Bz4Ph.

Síntese de complexos de antimônio(III) e bismuto(III) com *N*(4)-fenil 2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4Ph) e *N*(4)-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph)

Foram sintetizados os complexos $[\text{Sb}(\text{2Fo4Ph})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{2Ac4Ph})\text{Cl}_2]$, $[\text{Bi}(\text{2Fo4Ph})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Bi}(\text{2Ac4Ph})\text{Cl}_2]$ conforme procedimento descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo contendo 1,0 mmol da tiossemicarbazona de interesse em 10,00 mL de etanol, foi adicionado 1,0 mmol de SbCl_3 ou BiCl_3 sólido. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. O sólido obtido foi filtrado em papel de filtro sob vácuo, lavado com etanol e éter etílico e seco em estufa. Os complexos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, espectroscopia de infravermelho, por seus espectros de RMN de ^1H e por difração de raios X de monocristal.

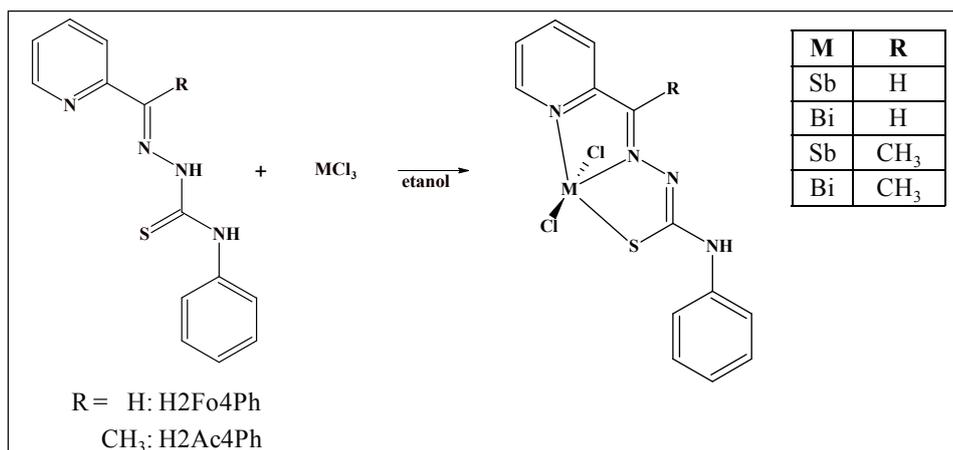


Figura 2.5. Esquemas de síntese de complexos de antimônio(III) e bismuto(III) com H₂Fo₄Ph e H₂Ac₄Ph.

Síntese de complexos de ouro(I) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H₂Ac₄DH), seus derivados *N*(4)-metil (H₂Ac₄Me) e *N*(4)-fenil- (H₂Ac₄Ph) substituídos e com *N*(4)-fenil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H₂Bz₄Ph)

Foram sintetizados os complexos de ouro(I) [Au(H₂Ac₄DH)Cl]·CH₃OH, [Au(H₂Ac₄Me)Cl]Cl, [Au(H₂Ac₄Ph)Cl]Cl·2H₂O e [Au(H₂Bz₄Ph)Cl]Cl pelo método descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo envolvido com papel laminado foi dissolvido 1,0 mmol de HAuCl₄ em 10 mL de metanol/acetona (1:1) e em seguida foi adicionada lentamente quantidade equimolar da tiossemicarbazona sólida desejada. A mistura ficou submetida a agitação por 2 h. Ao fim desse tempo, esta foi filtrada em papel de filtro sob vácuo e o sólido obtido foi lavado com acetona e seco ao ar.

Os produtos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, análise termogravimétrica, por seus espectros de infravermelho e de RMN de ¹H e por difração de raios X de monocristal.

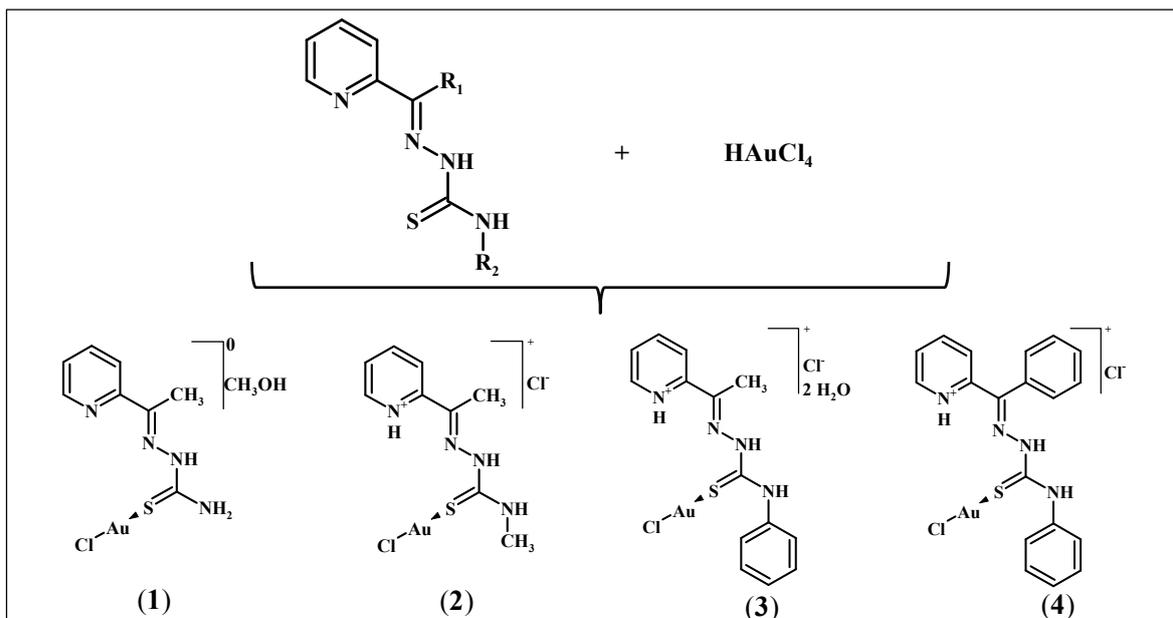


Figura 2.6. Esquemas de síntese de complexos de ouro(I) com H₂Ac4DH, H₂Ac4Me e H₂Ac4Ph e H₂Bz4Ph.

Preparação de glicoxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) (H₂Gy3DH) e seus derivados *N*(3)-metil- (H₂Gy3Me), *N*(3)-etil- (H₂Gy3Et) e *N*(3)-fenil- (H₂Gy3Ph) substituídos

Em um balão de fundo redondo contendo 10,0 mmol de glicoxaldeído em 20,0 mL de etanol sob agitação, foram adicionados 20,0 mmol da tiossemicarbazida desejada. Em seguida foram adicionadas 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. A mistura reacional foi submetida a refluxo por 3 h e permaneceu sob agitação por 6 h. Ao fim desse tempo, o sólido obtido foi filtrado em papel de filtro sob vácuo e lavado com éter. O produto foi seco em estufa.

As tiossemicarbazonas foram caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C.

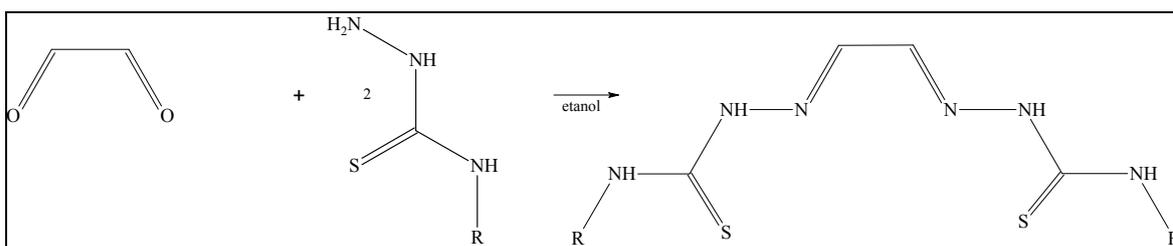


Figura 2.7. Esquemas de síntese de H₂Gy3DH, H₂Gy3Me, H₂Gy3Et e H₂Gy3Ph.

Síntese de complexos de bismuto(III) com glicoxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) (H₂Gy3DH) e seus derivados *N*(3)-etil- (H₂Gy3Et) e *N*(3)-fenil- (H₂Gy3Ph) substituídos

Foram obtidos os complexos de bismuto(III) [Bi(H₂Gy3DH)Cl₃] (1), [Bi(H₂Gy3Et)(OH)₂Cl] (2) e [Bi(H₂Gy3Ph)Cl₃] (3) pelo método descrito a seguir.

Em um balão de fundo redondo contendo 1,0 mmol da *bis*(tiossemicarbazona) de interesse em 10 mL de metanol, foi adicionada lentamente quantidade equimolar de BiCl_3 sólido. A mistura foi submetida a refluxo por 4 h e permaneceu sob agitação por 24 h. Ao fim desse tempo, esta foi filtrada em papel de filtro sob vácuo e lavada com metanol e em seguida com acetona. O sólido obtido foi seco em estufa.

Os complexos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, dosagem de bismuto por absorção atômica, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia eletrônica e por seus espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT.

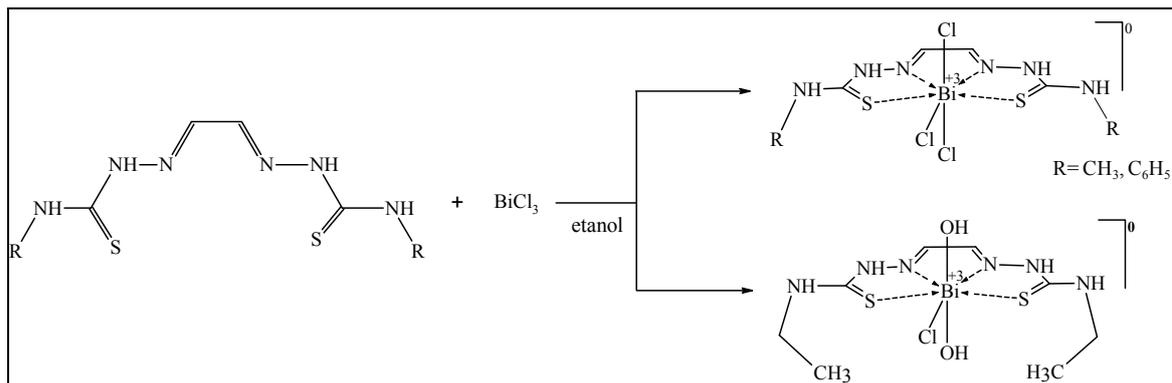


Figura 2.8. Esquemas de síntese complexos de bismuto(III) com $\text{H}_2\text{Gy3DH}$, $\text{H}_2\text{Gy3Me}$, $\text{H}_2\text{Gy3Et}$ e $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$.

Síntese de complexos de ouro(I) e ouro(III) com glicoxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) ($\text{H}_2\text{Gy3DH}$) e seus derivados *N*(3)-metil- ($\text{H}_2\text{Gy3Me}$) e *N*(3)-etil- ($\text{H}_2\text{Gy3Et}$) substituídos

Foram sintetizados os complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$, $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$, conforme metodologia descrita a seguir.

Em um balão de fundo redondo contendo 0,5 mmol da *bis*(tiossemicarbazona) de interesse em 10 mL de metanol, foi adicionada lentamente quantidade equimolar de HAuCl_4 sólido. A mistura foi submetida a refluxo por 2 h e permaneceu sob agitação por 3 h. Ao fim desse tempo, esta foi filtrada em papel de filtro sob vácuo e lavada com metanol e em seguida com acetona. O sólido obtido foi seco em estufa.

Os complexos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, por seus espectros eletrônicos, de infravermelho, de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT e por eletroquímica (voltametria cíclica).

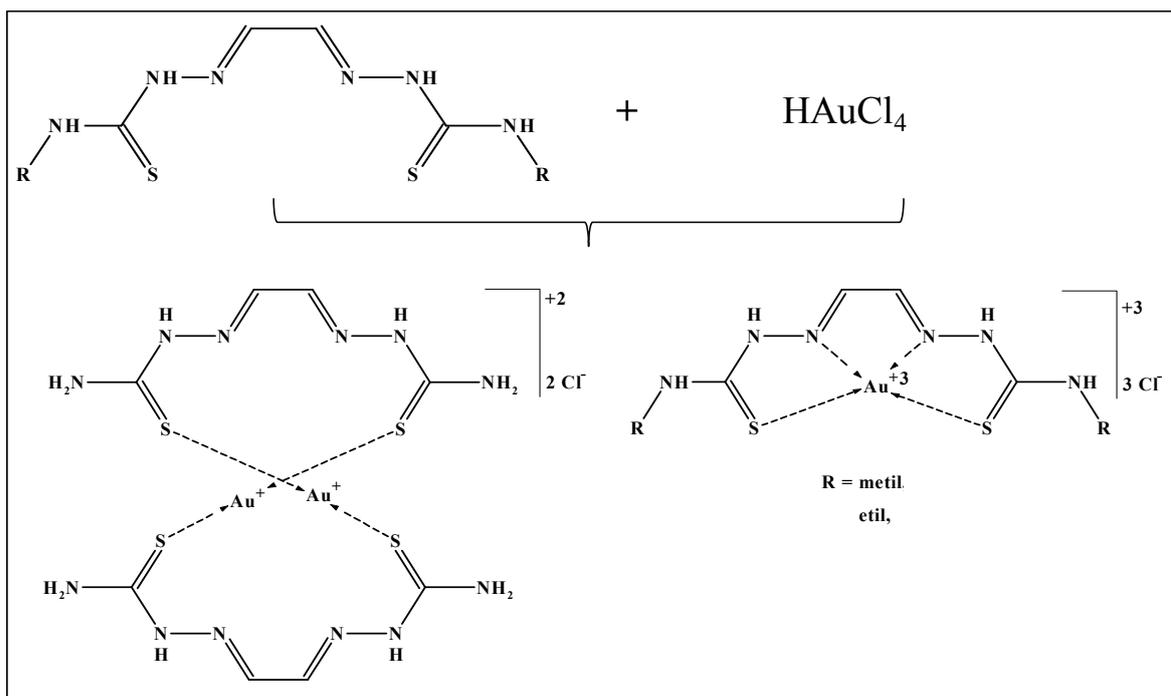


Figura 2.9. Esquemas de síntese de complexos de ouro(I) e ouro(III) com de H₂Gy3DH, H₂Gy3Me e H₂Gy3Et.

2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Atividade antimicrobiana

Os estudos de atividade antimicrobiana dos compostos foram realizados pelo método de macrodiluição em série⁴, seguindo-se os padrões do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{5,6}.

Foram utilizadas as cepas de bactérias *gram*-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), de bactérias *gram*-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e do fungo *Candida albicans*. A referência para a turbidez do inóculo foi medida em espectro eletrônico, nos comprimentos de onda 530 nm e 625 nm, devendo fornecer os valores 0,08 e 0,1, respectivamente, de forma que a concentração do inóculo em caldo Mueller Hinton (bactérias) ou caldo Sabouraud (fungo) foi de 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC). Foi adicionado o inóculo em 10 tubos de diluição contendo as substâncias testadas, de modo que sua concentração em cada tubo foi de 10⁵ UFC. Como controles positivos foram usados os

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

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

⁶ 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, Pennsylvania, USA, 2003).

fármacos cloridrato de tetraciclina, ciprofloxacina (bactérias) ou fluconazol (fungo). Como controle negativo foi usada a bactéria ou o fungo no meio de cultura apenas. Após 18 a 24 h de incubação em estufa a 37 °C, foram feitas as análises da inibição e determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos compostos testados.

Atividade citotóxica

Os testes de atividade citotóxica dos compostos foram realizados no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, em colaboração com a Dra. Raquel G. dos Santos e com a doutoranda Marcella A. Soares, e no Departamento de Fisiologia da UFMG, em colaboração com a Prof. Dra. Elaine M. Souza-Fagundes.

• Atividade citotóxica – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

Linhagens de células e condições de cultura

Células tumorais de glioblastoma RT2, T98G, U87 e de carcinoma de mama MCF-7 foram mantidas no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (50 U mL⁻¹ de penicilina/50 µmol L⁻¹ de estreptomicina), sob atmosfera de 5% CO₂/ 95% ar a 37 °C por 24 h.

Atividade Citotóxica

Para determinar os valores de CI₅₀ (concentração inibitória da proliferação de 50% de células), os efeitos citotóxicos foram quantificados através do ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). O MTT é um sal de coloração amarela, que é reduzido por desidrogenases mitocondriais de células vivas apenas, formando um produto de coloração roxa, insolúvel em água (Formazan)⁷. As células foram sedimentadas em placas de 96 poços, na densidade celular de 1 x 10³ – 2 x 10³ células/poço e tratadas com diferentes concentrações (1 x 10⁻¹² mol L⁻¹ – 1 x 10⁻³ mol L⁻¹) dos compostos previamente dissolvidas em DMSO, de modo que a concentração desse solvente no meio DMEM fosse menor que 0,50%. Foram utilizados cisplatina ou etoposídeo como controle positivo e DMSO (0,50%) como controle negativo. Após 48 h de incubação a 37 °C, o MTT foi adicionado em cada poço e depois de mais 4 h de incubação, adicionou-se DMSO para dissolver o Formazan precipitado. A absorbância das soluções resultantes foi medida a 570 nm, absorção característica do composto Formazan. A medida da absorbância é uma medida da viabilidade metabólica celular, uma vez que quanto menor o número de células vivas, menor a produção de Formazan e, portanto, menor a absorbância. Todos os testes foram feitos em triplicata.

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

Análise morfológica das células tumorais

As células de todas as linhagens foram tratadas com os compostos ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e mudanças morfológicas foram analisadas após 48 h de incubação por microscópio contraste de fase (Nikon). Alterações no ADN foram detectadas por coração com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma). Após 48 h de incubação com os compostos ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), as células foram lavadas com tampão fosfato (Phosphate buffered saline, PBS) e incubadas com DAPI ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 1 h. Em seguida, as células foram fixadas com metanol 70% a temperatura ambiente por 30 min. Alterações do ADN, como condensação e fragmentação foram observados por microscópio de fluorescência (Nikon – 385 - 410 nm).

Ensaio de coloração simultânea com brometo de etídio e laranja de acridina

O ensaio de coloração celular simultânea com os intercalantes de ADN brometo de etídio/laranja de acridina permite diferenciar células vivas, apoptóticas, necróticas e autofágicas⁸.

O corante brometo de etídio penetra somente em células que apresentam a membrana danificada e interage com o ADN, emitindo fluorescência verde. O corante laranja de acridina, por sua vez, penetra em células intactas e interage com o ADN desnaturado, emitindo fluorescência vermelha, ou com o ADN de fita dupla, emitindo fluorescência verde. Este corante também se acumula em organelas com ambiente ácido, emitindo fluorescência vermelha. Uma vez que autofagia caracteriza-se, dentre outros, por formação de vacúolos ácidos (vacúolos autofágicos), o corante laranja de acridina tem sido utilizado para determinação desse tipo de morte celular.

O ensaio foi realizado de acordo com Baskic e colaboradores⁹. Células MCF-7, U87 e T98G foram sedimentadas em placas de 96 poços e tratadas com os compostos ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 h. Em seguida, as células foram incubadas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de laranja de acridina (Sigma) e com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídio (Sigma) por 15 min. O meio de cultura foi removido e foram obtidas fotomicrografias de fluorescência pelo uso de microscópio invertido de fluorescência (Nikon, 530 - 650 nm).

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos compostos estudados foi avaliada de acordo com Fisher e colaboradores¹⁰. Sangue humano coletado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi centrifugado a 700g por 10 min. O material foi lavado por centrifugação três vezes com tampão PBS pH 7,4 gelado e ressuspensionado no mesmo tampão. Uma vez isolados, os

⁸ R. F. Beers, J. Bacteriol. 88 (1964) 1249.

⁹ Baskic, D.; Popovi, S.; Ristic, P.; Nebojsa, N.; Arsenijevic, Cell. Biol. Internat.30 (2006) 924.

¹⁰ D. Fisher, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, Biomaterials 24 (2003) 1121.

eritrócitos foram incubados com diferentes concentrações dos compostos testados por 1 h a 37 °C sob agitação branda e constante. A hemoglobina liberada dos eritrócitos após centrifugação foi determinada por análise fotométrica a 540 nm. A quantidade de hemoglobina liberada reflete a capacidade dos compostos testados em romper a membrana celular. O controle positivo constituiu-se de 100% de hemólise, a qual foi produzida usando-se Triton X-100 (polioxietileno octilfenil éter). Hemólise menor que 10% foi considerada como efeito não tóxico pelos compostos. Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos duas vezes.

•Atividade citotóxica – Laboratório de Fisiologia da UFMG

Linhas de células e condições de cultura

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

Atividade citotóxica

As linhagens de células Jurkat, HCT-116 (ambas 1 x 10⁵ células/poço), HL-60 (5 x 10⁴ células/poço) e MCF-7 (4 x 10⁴ células por poço) foram incubadas com os compostos (10 µmol L⁻¹) por 48 h em atmosfera de 5% CO₂. Células controles foram tratadas com 0,1% DMF ou DMSO (controle negativo) ou com 10 µmol L⁻¹ de cisplatina ou auranofina (controles positivos). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT.

Após 48 h de incubação a 37 °C, o MTT foi adicionado em cada poço e depois de mais 4 h de incubação, adicionou-se HCl 0,04 mol L⁻¹ em isopropanol para dissolver o Formazan precipitado. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 595 nm.

Compostos que inibiram mais de 50% da proliferação celular foram selecionados para determinação de CI₅₀. Para tal, foram utilizados os compostos em concentrações de 100 a 0,01 µmol L⁻¹. Foram feitos três experimentos independentes realizados em triplicata.

Avaliação de efeito citotóxico sobre células mononucleares de sangue periférico humano

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

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram isoladas conforme o método descrito por Gazzinelli e colaboradores¹¹. O sangue foi inserido em tubos contendo uma mistura de Histopaque (Sigma) na proporção de uma parte de Histopaque para duas partes de sangue. Essa preparação foi então centrifugada por 40 minutos a 1400 rpm e a 18 °C. Após a centrifugação, as células foram lavadas e a densidade celular foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ células/mL. 100 µL desta suspensão ($2,5 \times 10^5$ células) foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços e as células foram incubadas por 24 h com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Após este período, as células foram cultivadas em presença de diferentes concentrações dos compostos selecionados (100 a $0,00001 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 h em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram mantidas em meio de cultivo completo (CMBLAST) contendo RPMI (Sigma), suplementado com 5% de soro humano normal AB Rh+ previamente inativado, 3% de L-Glutamina (solução estoque 200 mmol L^{-1}), 2% da mistura de antibiótico-antimicótico (solução estoque 1000 U mL^{-1} de penicilina e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizada a auranofina como controle positivo. A proliferação e a viabilidade celular foram determinadas pelo ensaio de redução de MTT.

Ensaio de fragmentação de ADN

As células normais apresentam o conteúdo de ADN igual a 2n ou 4n, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. Entretanto, as células em apoptose apresentam este conteúdo menor que 2n, uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo, sendo esta fase chamada de subdiploidia. O conteúdo de ADN sub-diplóide foi determinado para a quantificação da fragmentação do ADN celular, o qual é uma das características de morte celular por apoptose. Este ensaio foi utilizado como método preditivo do potencial pró-apoptótico dos compostos. O estudo foi realizado com base no método descrito por Nicoletti e colaboradores¹². As células controle e tratadas com os compostos foram centrifugadas a 200g por 5 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi lisado com 250 µL de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS) contendo $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Iodeto de Propídio -PI (Sigma), 0,1% de Triton X-100 (Sigma) e 0,1 % de citrato de sódio (Sigma). As amostras foram transferidas para um microtubo, homogeneizadas e incubadas por 4 h a 8 °C. Após incubação as amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

A incubação das células com a solução fluorocrômica hipotônica (HFS) leva à fragilização da membrana celular pela ação do triton-X100 e o choque hipotônico provoca o

¹¹ G. Gazzinelli, N. Katz, R.S. Rocha, D.G. Colley, J. Immunol. 130 (1983) 2891.

¹² I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, J. Immunol. Meth. 139 (1991) 271.

rompimento da mesma. O material nuclear se torna acessível ao PI, que irá se intercalar no ADN nuclear. O conteúdo de ADN subdiplóide foi determinado pelo programa CellQuest (Becton Dickinson).

Cálculos teóricos: estudo da relação estrutura-atividade (SAR)

Os cálculos computacionais foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. William R. Rocha.

Foi realizada análise conformacional de isômeros *E* e *Z* de tiossemicarbazonas utilizando-se o programa Tinker¹³. As conformações mais estáveis dos isômeros foram otimizadas segundo a Teoria do Funcional da Densidade (DFT)¹⁴, empregando-se o funcional de troca-correlação híbrido B3LYP^{15,16} e utilizando-se a função de base cc-pVDZ^{17,18,19} para todos os átomos. Em seguida, foram realizados cálculos no ponto segundo a Teoria de Perturbação de segunda ordem de Møller-Plesset^{20,21} para as estruturas previamente otimizadas, utilizando-se a mesma função de base.

Os elétrons da camada interna do átomo de iodo foram tratados com o pseudopotencial LANL2DZ²², sendo que a função de base duplo- ζ foi usada para tratar os elétrons de valência (5s, 5p).

A distribuição das cargas nos confôrmeros mais estáveis foi calculada usando o formalismo “Orbital Natural de Ligação” (em inglês “Natural Bonding Orbital”, NBO)^{23,24}. Todos os cálculos de mecânica quântica foram realizados utilizando-se o programa Gaussian²⁵. Após completa otimização de geometria, foram obtidas as seguintes propriedades: energia do orbital molecular ocupado de maior energia (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO), energia do orbital molecular não ocupado de menor energia (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO), dipolo e cargas NBO dos átomos potencialmente coordenantes enxofre, nitrogênio piridínico (N_{py}) e nitrogênio imínico (N_{im}), os quais foram utilizados como descritores para os estudos de SAR. As estruturas tridimensionais das moléculas previamente otimizadas foram utilizadas no programa Marvin²⁶ para calcular a área da superfície molecular.

¹³ 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.

¹⁴ R.G. Parr, W. Yang, W. Density-Functional Theory of Atoms and Molecule, Oxford University Press, Oxford, 1989.

¹⁵ A.D. Becke, J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648.

¹⁶ C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785.

¹⁷ T.H. Dunning Jr, J. Chem. Phys. 90 (1989) 1007.

¹⁸ R. Ditchfield, W.J. Hehre, J.A. Pople, J. Chem. Phys. 54 (1971) 724.

¹⁹ W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, J. Chem. Phys. 56 (1972) 2257.

²⁰ C. Møller, M.S. Plesset, Phys. Rev. 46 (1934) 618.

²¹ A. Szabo, N.S. Ostlund, Modern Quantum Chemistry, Introduction to Advanced Electronic Structure Theory, Dover Publication, Inc: New York, 1996.

²² P.J. Hay, W.R. Wadt, J. Chem. Phys. 82 (1985) 284.

²³ A.E. Reed, F. Weinhold, J. Chem. Phys. 78 (1983) 4066.

²⁴ A.E. Reed, R.B. Weinstock, F. Weinhold, J. Chem. Phys. 83 (1985) 735.

²⁵ M.J. Frisch et al, Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

²⁶ MarvinSketch 5.5.1.0 Program. ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/products.html>.

Foram calculados os valores de logaritmo do coeficiente de partição óleo-água (logP) das tiossemicarbazonas pelo programa ALOGPS 2.1²⁷. Área da superfície molecular e logP também foram utilizados como descritores nos estudos de SAR.

Efeito sobre a polimerização da tubulina

O ensaio de polimerização da tubulina foi realizado por Livia B. Salum na *University of Pittsburgh, Department of Pharmaceutical Sciences*, sob a orientação do Pro. Dr. Billy W. Day e em colaboração com o Dr. Hikmat N. Daghestani.

Tubulina purificada de cérebro bovino (concentração 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi pré-incubada em placas de 96 poços com soluções dos compostos de interesse em DMSO 1% e com glutamato monossódico (0,8 mol L^{-1}) a 30 °C. As misturas reacionais foram resfriadas a 0 °C por 10 min, sendo em seguida adicionado guanosina trifosfato (GTP) e imediatamente após foram feitas leituras espectrofotométricas em 350 nm. As linhas de base foram estabelecidas e a temperatura foi lentamente aumentada para 37 °C. O valor de turbidez determinado após 20 min a 37 °C para DMSO 1% foi considerado como 100% de polimerização e o valor de turbidez na presença de colchicina (2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi estabelecido como 0% de polimerização. Para observar a dependência dos efeitos com a concentração, a tubulina purificada foi incubada com quatro diferentes concentrações dos compostos.

Análise multiparamétrica para interrupção de mitose

O ensaio foi realizado por Livia B. Salum na *University of Pittsburgh, Department of Pharmaceutical Sciences*, sob a orientação do Pro. Dr. Billy W. Day e em colaboração com o Dr. Hikmat N. Daghestani.

Os efeitos dos compostos sobre a interrupção da mitose, a morfologia nuclear e os microtúbulos celulares foram estudados conforme metodologia previamente descrita^{28,29}. Células HeLa (carcinoma cervical humano) foram adicionadas em microplacas de 384 poços (8000 células/poço) e tratadas em quadruplicata com o veículo (DMSO 0,1%) ou com dez concentrações dos compostos 4-6 h após a sedimentação das células. As células ficaram incubadas com os compostos por 18 h a 37 °C e 5% de CO₂, em seguida foram fixadas com formaldeído e marcadas com o corante Hoechst (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em HBSS (Hank's balanced salt solution).

As células foram permeabilizadas com Triton-X100 0,5% (w/w) por 5 min a temperatura ambiente e incubadas com uma solução de HBSS contendo anticorpos primários

²⁷ Programa ALOGPS 2.1. Disponível em <http://www.vcclab.org/lab/alogps> (Acessado em abril de 2011).

²⁸ Z. Wang, P. A. McPherson, B. S. Raccor, R. Balachandran, G. Zhu, B. W. Day, A. Vogt, P. Wipf, *Chem. Biol. Drug Des.* 70 (2007) 75.

²⁹ A. Vogt, P.A. McPherson, X. Shen, R. Balachandran, G. Zhu, B.S. Raccor, S.G. Nelson, M. Tsang, B.W. Day, *Chem. Biol. Drug Des.* 74 (2009) 358.

anti-fosfo-histona H3, (Ser10, diluição 1:500, Upstate), e anti α -tubulina, (diluição 1:3000, Sigma). Em seguida foram adicionados os anticorpos secundários IgG marcados com isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate –FITC) (diluição 1:500) e IgG com Cy3 marcada, (diluição 1:500). As células foram então lavadas uma vez com HBSS e estocadas a 4 °C em HBSS para posterior análise.

As microplacas foram analisadas em um equipamento ArrayScanII (Cellomics), sendo obtidas imagens de 1000 células de cada poço em três diferentes comprimentos de onda de excitação/emissão, utilizando-se um conjunto de filtros Omega XF93 (Omega Optical): 350/461 nm (Hoechst), 494/519 nm (FITC) e 556/573 nm (Cy3). Os seguintes parâmetros foram usados para a análise dos dados: densidade celular (número de células vivas por unidade de volume), condensação nuclear, densidade de microtúbulos (determinado pela intensidade média de tubulina marcada por área) e índice mitótico (número de células em mitose - verificadas pelo marcador de fosfohistona H3 - dividido pelo número total de células).

Estudos de interação com ADN plasmidial

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

Estudos de inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR)

O estudo de inibição da atividade enzimática de TrxR isolada de fígado de camundongo (Sigma), foi realizado pelo ensaio de redução de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB). Neste ensaio, TrxR reduz a ligação dissulfeto de DTNB, levando à formação de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), o qual pode ser detectado fotometricamente.

O procedimento foi realizado de acordo com instruções da Sigma (Informação do produto T9698) e com Ott e colaboradores³⁰. Aliquotas de 20 μL de solução diluída de TrxR em tampão fosfato de potássio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 (contendo aproximadamente 0,10 unidades da enzima) foram incubadas por 1 h a 37 °C com 20 μL de soluções de complexos de ouro em dez diferentes concentrações na faixa de 0,05 a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou com DMF 2,5% (controle

³⁰ I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D.H.W. Vlecken, I.J. Marques, D. Kubutat, J. Will, W.S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop, C.P.J. Bagowski, J. Med. Chem. 52 (2009) 763.

negativo). Para tiossemicarbazona, *bis*(tiossemicarbazona), HAuCl_4 e auranofina, os experimentos foram realizados nas concentrações de 0,5, 5,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com o objetivo de comparar seus efeitos inibitórios com os dos complexos de ouro. As soluções foram transferidas quantitativamente para placas de 96 poços e a cada poço foram adicionados 200 μL de mistura reacional (10 mL de mistura reacional consistia de 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 1,0 mol L^{-1} pH 7,0, 0,2 mL de EDTA 500 mmol L^{-1} pH 7,5, 0,80 mL de DTNB 63 mol L^{-1} em etanol, 0,10 mL de albumina de soro bovino 20 mg mL^{-1} , 0,05 mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida 48 mmol L^{-1} (NADPH) e 7,85 mL de água). Imediatamente após a adição da mistura reacional, a formação de TNB foi monitorada em um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum) a 412 nm em intervalos de 2 s por 4 min. Para corrigir a formação de produto não-enzimático, também foi feita a leitura de poços com 40 μL de DMF 2,5% em tampão de fosfato 1,0 mol L^{-1} , pH 7,0 e 200 μL de mistura reacional (branco). Da leitura dos poços controles e tratados com os compostos foi subtraída a leitura do branco. A atividade enzimática foi calculada como a diferença entre a absorbância observada entre 0 min em 4 min (ΔAbs) de leitura. Os experimentos foram realizados em triplicata. As concentrações que inibem em 50% a atividade enzimática (CI_{50}) foram calculadas a partir da obtenção de curvas de dose-resposta ($\Delta \text{Abs vs log} [\text{inibidor}]$).

Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro

Os testes de atividade *anti-T. cruzi* de tiossemicarbazonas e de seus complexos de antimônio foram realizados no Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Pernambuco, em colaboração com a Dra. Valéria R.A. Pereira

Animais

Camundongos machos BALB/c (idade de 6 a 8 semanas) foram sacrificados e tratados de acordo com a Comissão para Experimentos com Animais em Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Ministério da Saúde, 0266/05).

Isolamento de células do baço

Células do baço foram isoladas de acordo com a literatura³¹. Após sacrifício dos animais com gás CO_2 , os baços foram removidos e macerados. O material foi transferido para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de RPMI 1640 e centrifugado a 4°C, a 200g por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e ao sedimento foi adicionada água destilada para promover o rompimento da membrana de células vermelhas do sangue. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado em RPMI 1640 e 10% de soro fetal

³¹ V.R.A. Pereira, V.M.B. Lorena, A.P.G. Silva, E.M. Coutinho, E.D. Silva, A.G.P. Ferreira, P. Miranda, M.A. Krieger, S. Goldenberg, M.B.P. Soares, R. Correa-Oliveira, Y.M. Gomes, Parasitol. 129 (2004) 563.

bovino. Uma alíquota de cada material ressuspensionado foi separada, diluída no corante azul de Trypan e as células viáveis foram quantificadas em uma câmara de Neubauer.

Estudos de citotoxicidade in vitro

A citotoxicidade dos compostos foi determinada utilizando-se esplenócitos de camundongos BALB/c cultivados em placas de 96 poços (6×10^5 células/poço) em meio RPMI 164 suplementado com 10% de soro fetal bovino e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (Novafarma). As células foram incubadas com os compostos em seis concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), na presença de [^3H]-timidina (Amersham Biosciences) ($1 \mu\text{Ci/poço}$), por 24 h a 37°C e 5 % de CO_2 . Após esse tempo, a incorporação de [^3H]-timidina por células viáveis foi determinada, utilizando-se um contador de radiação β (β -matrix 9600, Packard). A citotoxicidade dos compostos foi determinada pela porcentagem de incorporação de [^3H]-timidina (indicador de células viáveis) por células tratadas com os compostos em relação às células não tratadas (controle). Foram consideradas concentrações não citotóxicas as que promoveram redução menor do que 30 % da incorporação de [^3H]-timidina em relação às células controle.

Atividade anti-T. cruzi

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Y) foram cultivadas a 26°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de hemina, 1% de meio R9 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Os parasitas ($10^6/\text{mL}$) foram incubados na ausência (controle) ou presença dos compostos em diferentes concentrações. O crescimento celular foi determinado onze dias após a incubação e a determinação de células viáveis foi feita em um hemacitômetro, pelo qual foi determinada a concentração dos compostos que inibe em 50% o crescimento do parasita. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas a partir de células VERO (hospedeiras) mantidas em cultura a 37°C e transferidas para placas de 96 poços ($4 \times 10^5/\text{poço}$) em meio RPMI 1640 suplementada com 10% de soro fetal bovino e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Ao fim desse tempo, os parasitas viáveis foram contados em um hematocitômetro após 24 h de tratamento com os compostos. A porcentagem de inibição dos compostos foi calculada em relação às células controle.

Capítulo 3.

N(4)-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona e seus derivados N(4)- o-, m- e p-X-fenil-substituídos (X = F, Cl, I, NO₂): investigação do perfil farmacológico e estudos de mecanismo de ação citotóxica contra células de tumores sólidos

Tiossemicarbazonas apresentam, entre outras, aplicações como agentes antitumorais, antibacterianos e antivirais. A atividade antitumoral é conferida principalmente a tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas.

Visando verificar o efeito da substituição sobre as atividades antimicrobiana e citotóxica do composto α (N)-heterocíclico *N(4)*-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph, **1**), foram preparados seus derivados com os grupos substituintes flúor, cloro, iodo e nitro nas posições *orto*-, *meta*- e *para* de *N(4)*-fenil. Foram obtidas as tiossemicarbazonas: H2Ac4oFPh (**2**), H2Ac4mFPh (**3**), H2Ac4pFPh (**4**), H2Ac4oClPh (**5**), H2Ac4mClPh (**6**), H2Ac4pClPh (**7**), H2Ac4oIPh (**8**), H2Ac4mIPh (**9**), H2Ac4pIPh (**10**), H2Ac4oNO₂Ph (**11**), H2Ac4mNO₂Ph (**12**) e H2Ac4pNO₂Ph (**13**) (Figura 3.1).

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos compostos contra bactérias *gram*-positivas *Staphylococcus aureus*, *gram*-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e contra fungos *Candida albicans*.

Também foi investigada a atividade citotóxica de **1-13** contra células de glioblastoma e de tumor de mama. O mecanismo de morte celular promovido pelos **1-13** foi estudado através do uso simultâneo dos corantes brometo de etídio e laranja de acridina. Por fim, foi investigada a capacidade de H2Ac4pClPh (**7**) de interagir com a tubulina purificada, de promover a desorganização de microtúbulos em células tumorais HeLa e de induzir a interrupção do ciclo celular na mitose.

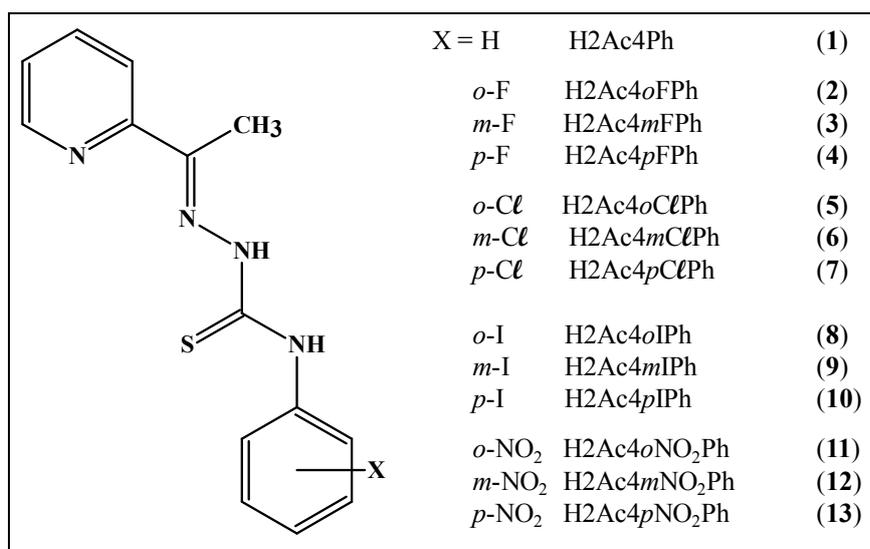


Figura 3.1. Estruturas de H2Ac4Ph e de seus derivados *N(4)*- *o*-, *m*- e *p*-X-fenil (X = F, Cl, I ou NO₂).

3.1. CARACTERIZAÇÃO DE *N(4)-FENIL-2-ACETILPIRIDINA TIOSSEMICARBAZONA E DE SEUS DERIVADOS N(4)- o-, m- e p-X-FENIL (X = Cl, F, I, NO₂)*

Análises realizadas por RMN e infravermelho confirmam a obtenção dos compostos **1**, **5-7** e **13**, os quais foram previamente descritos na literatura^{1,2,3,4}. A síntese dos compostos **2-4**, **11** e **12** foi descrita anteriormente¹, porém não há informações acessíveis sobre suas caracterizações. Os compostos **8-10** são inéditos. Dessa forma, neste capítulo, são descritas as caracterizações dos compostos **2-4** e **8-12**. Foram determinadas as estruturas dos compostos **2-4**, **6-8**, **10** e **11** por difração de raios X e os dados são apresentados na seção 3.2.

Cores, temperaturas de fusão, massas molares e rendimentos

Os rendimentos das reações, cores, temperaturas de fusão e massas molares dos compostos estão mostrados na Tabela 3.1.1. Verifica-se dentre os isômeros *orto*, *meta* e *para* que contêm o mesmo grupo substituinte, que o ponto de fusão dos compostos *para*-substituídos é o maior, enquanto que os compostos *orto*-substituídos apresentam menor ponto de fusão. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que a substituição na posição *orto*, por impedimento estérico, poderia dificultar as interações intermoleculares, enquanto que esse efeito é minimizado na posição *meta* e, de modo mais pronunciado, na posição *para*, como pode ser bem exemplificado pelos pontos de fusão das tiossemicarbazonas contendo grupo iodo-fenil.

Tabela 3.1.1. Cores, temperaturas de fusão, massas molares e rendimentos de reações para *N(4)- o-, m- e p-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (X = F, I ou NO₂)*

Composto	cor	P.F (°C)	MM (g mol ⁻¹)	Rendimento (%)
H2Ac4oFPh (2)	branco	159,9-161,3	288,34	66,7
H2Ac4mFPh (3)	branco	162,9-164,5	288,34	81,4
H2Ac4pFPh (4)	branco	164,9-165,8	288,34	70,9
H2Ac4oIPh (8)	branco	173,0-173,9	396,25	69,6
H2Ac4mIPh (9)	amarelo	175,9-177,9	396,25	94,5
H2Ac4pIPh (10)	amarelo claro	205,0-206,1	396,25	88,5
H2Ac4oNO ₂ Ph (11)	amarelo	159,1-159,8	315,35	89,9
H2Ac4mNO ₂ Ph (12)	amarelo	183,6-184,3	315,35	92,6

Espectros de Infravermelho

Os espectros de IV das tiossemicarbazonas apresentam bandas entre 3540-3040 cm⁻¹ atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação N-H⁵. Absorções na região de

¹ D.L. Klayman, J.F. Bartosevich, T.S. Griffin, C.J. Mason, J.P. Scovill, J. Med. Chem. 22 (1979) 855.

² D.X. West, J.J. Ingram III, N.M. Kozub, G.A. Bain, A.E. Liberta, Transition Met. Chem. 21 (1996) 52.

³ D.X. West, J.J. Ingram III, N.M. Kozub, G.A. Bain, A. E. Liberta, Transition Met. Chem. 21 (1996) 213.

⁴ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263.

⁵ D.X. West, H. Gegremedhin, T.J. Romack, A.E. Liberta, Transition Met. Chem., 19 (1994) 426.

1616-1581 cm⁻¹ são atribuídas a $\nu(\text{C}=\text{N})$, enquanto que bandas em 825-782 cm⁻¹ são atribuídas à vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$. Absorções referentes à deformação no plano do anel da piridina encontram-se em 631-616 cm⁻¹. Como exemplo, na Figura 3.1.1 é apresentado o espectro de IV de IV de H2Ac4*o*FPh (**2**). Na Tabela 3.1.2 estão sumarizadas as principais bandas observadas nos espectros de infravermelho de **2-4** e **8-12**, bem como suas atribuições.

Tabela 3.1.2. Atribuição das principais bandas de infravermelho (cm⁻¹) de *N*(4)- *o*-, *m*- e *p*-*X*-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas (*X* = F, I ou NO₂)

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\rho(\text{py})$
H2Ac4 <i>o</i> FPh (2)	3297, 3206m	1580F	784f	620f
H2Ac4 <i>m</i> FPh (3)	3296, 3250m	1610F	787f	622f
H2Ac4 <i>p</i> FPh (4)	3300, 3247m	1582F	825f	622f
H2Ac4 <i>o</i> IPh (8)	3306, 3208m	1582F	782	621
H2Ac4 <i>m</i> IPh (9)	3264m	1595F	786	616
H2Ac4 <i>p</i> IPh (10)	3294, 3232m	1581F	783	621
H2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph (11)	3217m	1608F	792f	621f
H2Ac4 <i>m</i> NO ₂ Ph (12)	3284m	1616F	800f	617f

Intensidade: F= forte, m= média. f= fraca

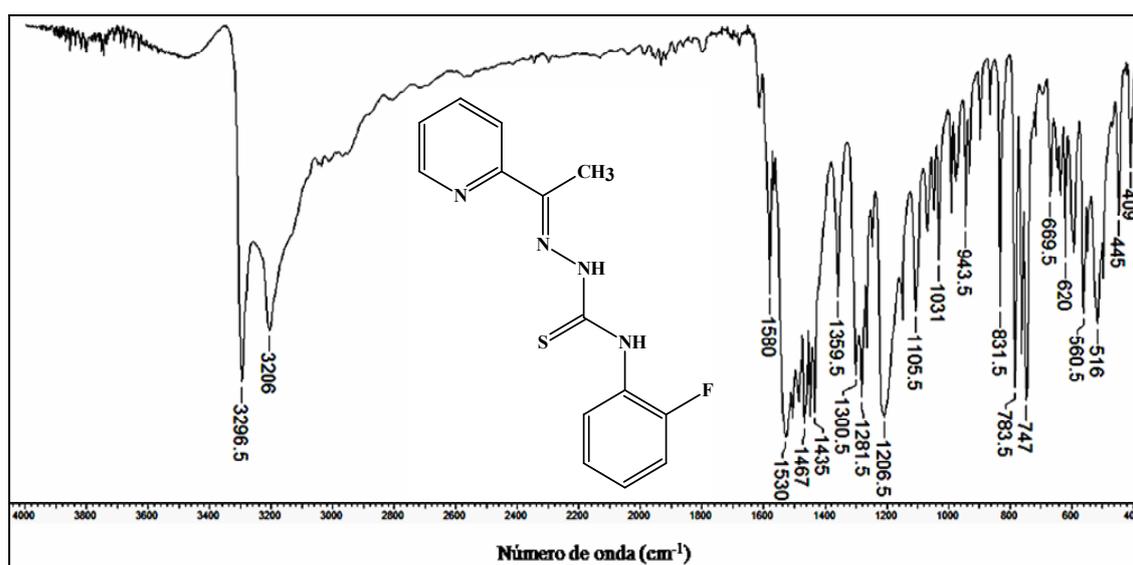


Figura 3.1.1. Espectro de infravermelho de H2Ac4*o*FPh (**2**), obtido em pastilha de KBr (4000-400 cm⁻¹).

Espectros de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, DEPT 135 e HMQC de **2-4** e **8-12** foram adquiridos em DMSO-*d*₆. Para todas as tiossemicarbazonas estudadas foi verificada a presença de sinais atribuídos aos isômeros configuracionais *Z* e *E*, sendo este último a espécie majoritária (89-96%). A numeração usada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das tiossemicarbazonas, bem como as estruturas dos isômeros configuracionais *E* e *Z* estão representadas na Figura 3.1.2.

Não foram observados todos os sinais de hidrogênio referentes ao isômeros *Z* pois alguns sinais estão sobrepostos aos sinais do isômero *E*. Uma vez que o isômero *Z* encontra-se em baixas concentrações, os sinais de carbono deste isômero não são observados nos espectros de RMN de ¹³C. Dessa forma a coleta de dados, bem como as atribuições de hidrogênios e carbonos foram realizadas apenas para o isômero *E*. As informações obtidas para isômeros *E* de **2-4** e **8-12** se encontram na Tabelas 3.1.3 e 3.1.4, em comparação com a tiossemicarbazona não substituída H2Ac4Ph (**1**).

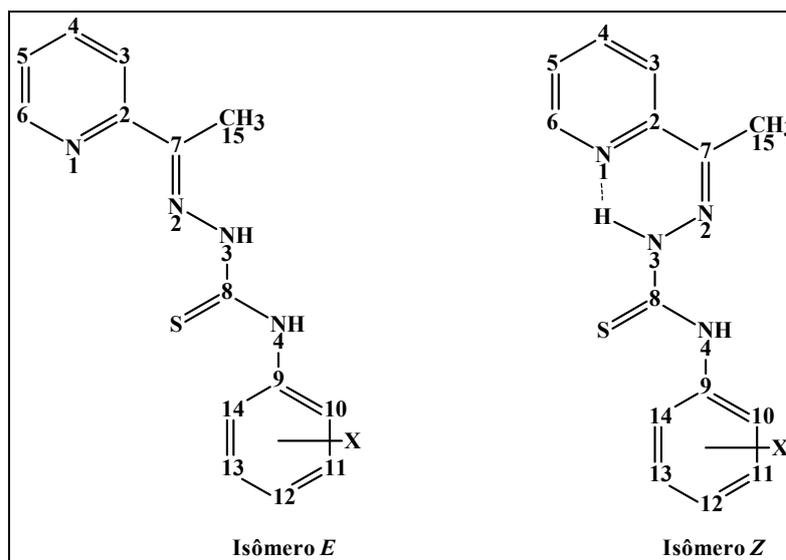


Figura 3.1.2. Isomêros configuracionais *E* e *Z* das tiossemicarbazonas substituídas em *N*(4)-fenil e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes. *X* = F, I ou NO₂.

A co-existência dos isômeros *E* e *Z* em solução é confirmada pelo sinal atribuído a N(3)-H. No isômero *Z* ocorre a ligação de hidrogênio entre N(3)-H e o nitrogênio da piridina (ver Figura 3.1.2). Dessa forma, esse hidrogênio amínico torna-se mais desblindado e seu sinal é observado na faixa de 12-15 ppm no espectro de RMN de ¹H⁶. Para o isômero *E*, essa ligação de hidrogênio intramolecular não pode se formar, mas forma-se uma ligação de hidrogênio entre N(3)-H e o solvente. Neste caso o sinal de RMN de ¹H atribuído a N(3)-H encontra-se em 10,60-10,90 ppm. A coexistência dos isômeros *E* e *Z* nas tiossemicarbazonas é exemplificada pelo espectro de RMN de ¹H de H2Ac4*m*FPh (**3**) (Figura 3.1.3).

⁶ R.F.F. Costa, A.P. Rebolledo, T. Matencio, H.D.R. Calado, J.D. Ardisson, M.E. Cortès, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, J. Coord. Chem. 58 (2005) 1307.

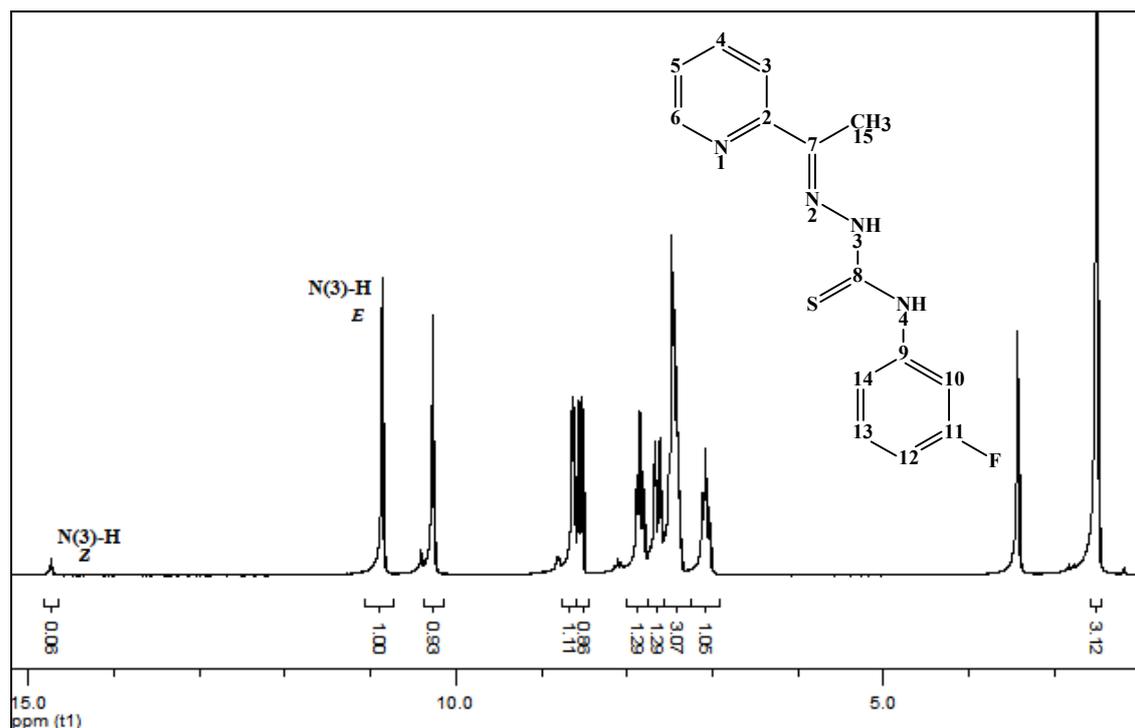


Figura 3.1.3. Espectro de RMN de ¹H de H₂Ac₄mFPh (3), obtido em DMSO-*d*₆.

A natureza do grupo substituinte não contribuiu para promover mudanças significativas no deslocamento dos sinais de hidrogênio e carbono do anel piridínico e do esqueleto das tiossemicarbazonas em relação ao composto não substituído **1** (ver Tabelas 3.1.3 e 3.1.4). De acordo com a posição e o tipo de substituinte, são observados deslocamentos significativos nos sinais de carbono e hidrogênio do grupo fenílico.

Para o composto H₂Ac₄*o*NO₂Ph (**11**), o sinal de N(4)-H encontra-se mais desblindado em relação às demais tiossemicarbazonas, sugerindo a formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio amínico e o oxigênio do grupo nitro. A presença da ligação intramolecular foi verificada na estrutura de **11** determinada por difração de raios X (seção 3.2) e prevista por cálculos teóricos (seção 3.3).

Os espectros de RMN de ¹³C dos compostos substituídos por flúor (**2-4**) apresentam os carbonos fenílicos duplicados devido ao acoplamento com ¹⁹F (*I* = 1/2), conforme pode ser verificado no espectro de RMN de ¹³C de H₂Ac₄mFPh (**3**) (Figura 3.1.4).

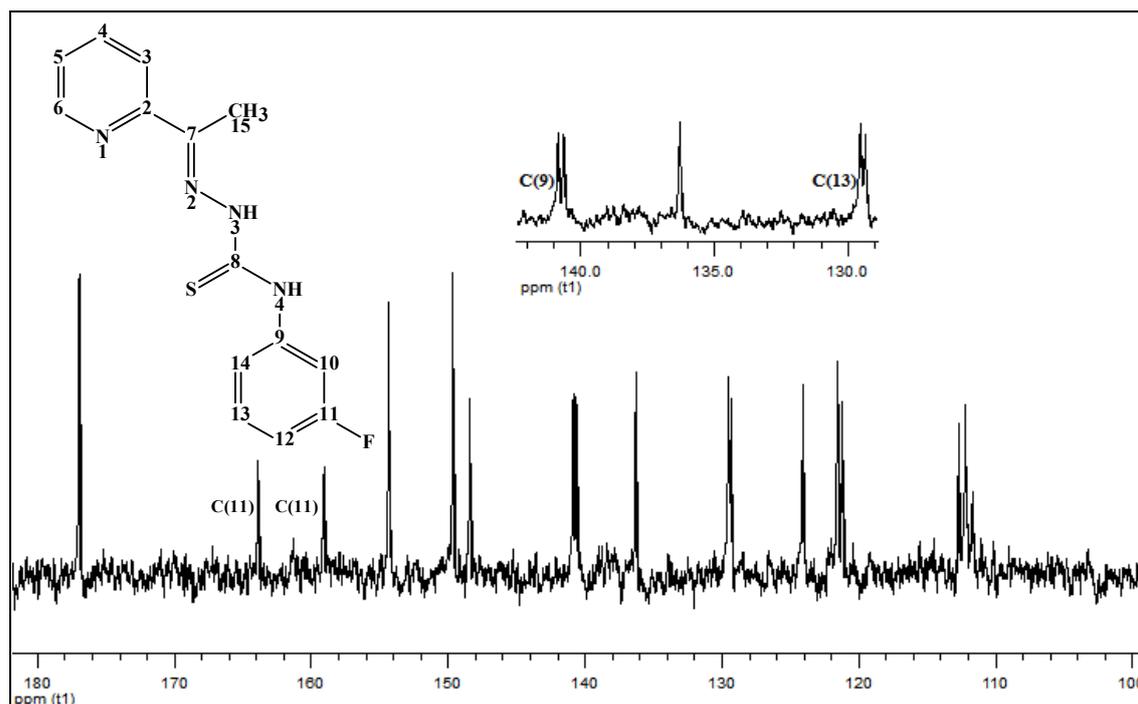


Figura 3.1.4. Espectro de RMN de ¹³C de H₂Ac4mFPh (3) obtido em DMSO-*d*₆ (δ: 180 - 100 ppm).

Os sinais de carbono diretamente ligados ao substituinte iodo em **8-10** sofrem acentuado deslocamento para região de campo alto em relação às demais tiossemicarbazonas. Como o átomo de iodo é o substituinte menos eletronegativo, os elétrons do carbono são mais fracamente atraídos por este átomo. Assim, os carbonos ligados ao iodo tornam-se mais blindados do que os carbonos ligados aos demais substituintes. O flúor, ao contrário do iodo, apresenta a maior eletronegatividade dentre os substituintes, promovendo, assim, a maior desblindagem do carbono substituído do anel fenílico.

Tabela 3.1.3. Atribuição (A), número de hidrogênios (N°), multiplicidade^a e deslocamento químico (δ) dos sinais de RMN de ¹H do isômero *E* de H₂Ac_{4o}FPh (2), H₂Ac_{4m}FPh (3), H₂Ac_{4p}FPh (4), H₂Ac_{4o}IPh (8), H₂Ac_{4m}IPh (9) e H₂Ac_{4p}IPh (10), H₂Ac_{4o}NO₂Ph (11) e H₂Ac_{4m}NO₂Ph (12) em comparação com H₂Ac₄Ph (1) (200 MHz, DMSO-*d*₆)

A	N°	δ (ppm)								
		(1) (E, 88%)	(2) (E, 93%)	(3) (E, 88%)	(4) (E, 93%)	(8) (E, 95%)	(9) (E, 87%)	(10) (E, 94%)	(11) (E, 93%)	(12) (E, 93%)
N(3)H	1	10,61 (s)	10,90 (s)	10,86 (s)	10,74 (s)	10,90 (s)	10,83 (s)	10,79 (s)	11,18 (s)	11,04 (s)
N(4)H	1	10,22 (s)	10,07 (s)	10,27 (s)	10,19 (s)	10,14 (s)	10,22 (s)	10,19 (s)	11,04 (s)	10,47 (s)
H(6)	1	8,58 (d)	8,61 (d)	8,63 (d)	8,60 (d)	8,61 (d)	8,62 (d)	8,60 (d)	8,63 (d)	8,72 - 8,45 (m)
H(3)	1	8,48 (d)	8,55 (d)	8,54 (d)	8,56 (d)	8,57 (d)	8,55 (d)	8,52 (d)	8,46 (d)	8,55 (d)
H(4)	1	7,81 (d)	7,81 (dd)	7,85 (dd)	7,82 (dd)	7,87 (dd)	7,84 (dd)	7,82 (t)	8,00 - 7,70 (m)	7,87 (t)
H(5)	1	7,45-7,30 (m)	7,50-7,35 (m)	7,55-7,35 (m)	7,40 (t)	7,50-7,35 (m)	7,42 (t)	7,50-7,35 (m)	7,60-7,30 (m)	7,44 (t)
H(10)	1	7,53 (d)	-	7,66 (d)	7,60-7,48 (m)	-	7,98 (s)	7,73 (d)	-	8,72 - 8,45 (m)
H(11)	1	7,45-7,30 (m)	7,50-7,20 (m)	-	7,22 (t)	7,64 (d)	-	7,50-7,35 (m)	8,29 (d)	-
H(12)	1	7,22 (dd)	7,61 (t)	7,55-7,35 (m)	-	7,50 - 7,35 (m)	7,64 (t)	-	8,00 - 7,70 (m)	8,10 (t)
H(13)	1	7,45-7,30 (m)	7,50-7,20 (m)	7,10 (t)	7,22 (t)	7,07 (t)	7,19 (t)	7,50-7,35 (m)	7,60-7,30 (m)	7,68 (t)
H(14)	1	7,53 (d)	7,50-7,20 (m)	7,55-7,35 (m)	7,60- 7,48 (m)	7,93 (d)	7,64 (t)	7,73 (d)	8,13 (d)	8,10 (t)
H(15)	3	2,44 (s)	2,47 (s)	2,51 (s)	2,47 (s)	2,49 (s)	2,49 (s)	2,470 (s)	2,50 (s)	2,52 (s)

^aInformações sobre multiplicidade se encontram entre parêntesis. s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; dd = duplo duplete; m = multiplete.

Tabela 3.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹³C e DEPT 135 de H₂Ac_{4o}FPh (2), H₂Ac_{4m}FPh (3), H₂Ac_{4p}FPh (4), H₂Ac_{4o}IPh (8), H₂Ac_{4m}IPh (9), H₂Ac_{4p}IPh (10), H₂Ac_{4o}NO₂Ph (11) e H₂Ac_{4m}NO₂Ph (12) em comparação com H₂Ac₄Ph (1) (200 MHz, DMSO-*d*₆)

A	DEPT	δ (ppm)								
		(1)	(2)	(3)	(4)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
C2	-	154,56	154,37	154,33	154,41	154,42	154,32	154,34	154,24	154,27
C3	↑	121,48	121,04	121,51	121,18	121,07	121,21	121,19	120,94	121,23
C4	↑	136,75	136,25	136,28	136,26	136,33	136,28	136,70	136,69	136,29
C5	↑	124,43	124,04	124,08	124,04	124,01	124,08	124,07	124,43	124,16
C6	↑	148,69	148,39	148,40	148,39	148,39	148,39	148,41	148,61	148,43
C8=S	-	177,39	178,33	176,94	177,57	177,43	177,01	176,98	177,10	177,15
C7=N	-	149,38	149,24	149,64	149,24	148,87	149,54	149,51	150,11	150,23
C9	-	139,19	127,33 127,09	140,84 140,63	135,46 135,41	141,07	140,43	138,93	135,74	140,23
C10	-	126,32	159,66 154,76	112,70 112,21	128,51 128,35	99,50	134,07	136,29	143,05	132,10
C11	-	128,39	115,78 115,39	163,86 159,06	114,92 114,47	128,26	93,27	128,15	133,85	147,20
C12	-	125,88	123,98 123,91	112,10 111,68	162,14 157,33	128,15	125,56	90,17	128,59	129,12
C13		128,39	130,05	129,51 129,33	114,92 114,47	138,42	129,89	128,15	125,00	119,93
C14		126,32	128,20 128,04	121,51 121,55	128,51 128,35	129,26	133,93	136,29	119,16	119,79
C15	↑	12,75	12,42	12,55	12,44	12,44	12,55	12,54	12,84	12,67

3.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS

Cristais de **2-4**, **6-8**, **10** e **11** foram obtidos da solução-mãe ou em solução de DMSO-*d*₆ e submetidos a análise por difração de raios X de monocristal. Os dados dos compostos foram coletados a temperatura ambiente (293 K) no difratômetro Oxford GEMINI, no modo θ - 2θ . As estruturas foram resolvidas por método direto e refinadas pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa em F^2 , sendo utilizados os programas SHELXS-97⁷, SHELXL-97⁸ e WinGX⁹.

Os resumos da coleção de dados e do refinamento estão dispostos na Tabela 3.2.1. As estruturas determinadas para os compostos e a numeração proposta estão apresentadas na Figura 3.2.1. As distâncias e ângulos de ligação encontram-se nas Tabelas 3.2.2 e 3.2.3 em comparação com os dados de H2Ac4Ph (**1**)¹⁰ e H2Ac4*o*ClPh (**5**)¹¹. Na Tabela 3.2.4 são apresentadas as ligações de hidrogênio para os compostos **2-4**, **6-8**, **10** e **11**.

As tiossemicarbazonas H2Ac4*m*FPh (**3**) e H2Ac4*p*FPh (**4**) cristalizaram-se no sistema triclinico, enquanto que os demais compostos cristalizaram-se no sistema monoclinico. Todos os compostos apresentam configuração *E* em relação a C(7)=N(2) e conformação *EE*, em relação às ligações C(7)=N(2) e N(3)-C(8). A substituição não contribui para afetar o comprimento das ligações do esqueleto das tiossemicarbazonas. Esse comportamento também foi verificado para o composto H2Ac4*o*ClPh (**5**)¹¹.

Para todos os compostos, verifica-se a presença da ligação de hidrogênio intermolecular N(3)—H(3)···S(1), conforme pode ser verificado na Figura 3.2.2. Esta ligação de hidrogênio está relacionada a uma operação de simetria (centro de inversão), gerando dímeros. Uma fraca ligação de hidrogênio intramolecular N(4)—H(4)···N(2) está presente em todas as estruturas, exceto nas estruturas de H2Ac4*m*ClPh, H2Ac4*p*ClPh e H2Ac4*o*IPh (**6-8**). Esta ligação de hidrogênio provavelmente impede a rotação em torno da ligação N(4)-C(8) e poderia contribuir para a estabilidade da conformação *EE*.

⁷ G.M. Sheldrick, SHELXS-97: Program for the Solution of Crystal Structures; University of Göttingen, Germany (1997).

⁸ G.M. Sheldrick, SHELXL-97: Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany (1997).

⁹ L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst., 32 (1999) 837.

¹⁰ E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D.X. West, Z. Anorg. Allg. Chem. 625 (1999) 961.

¹¹ 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.

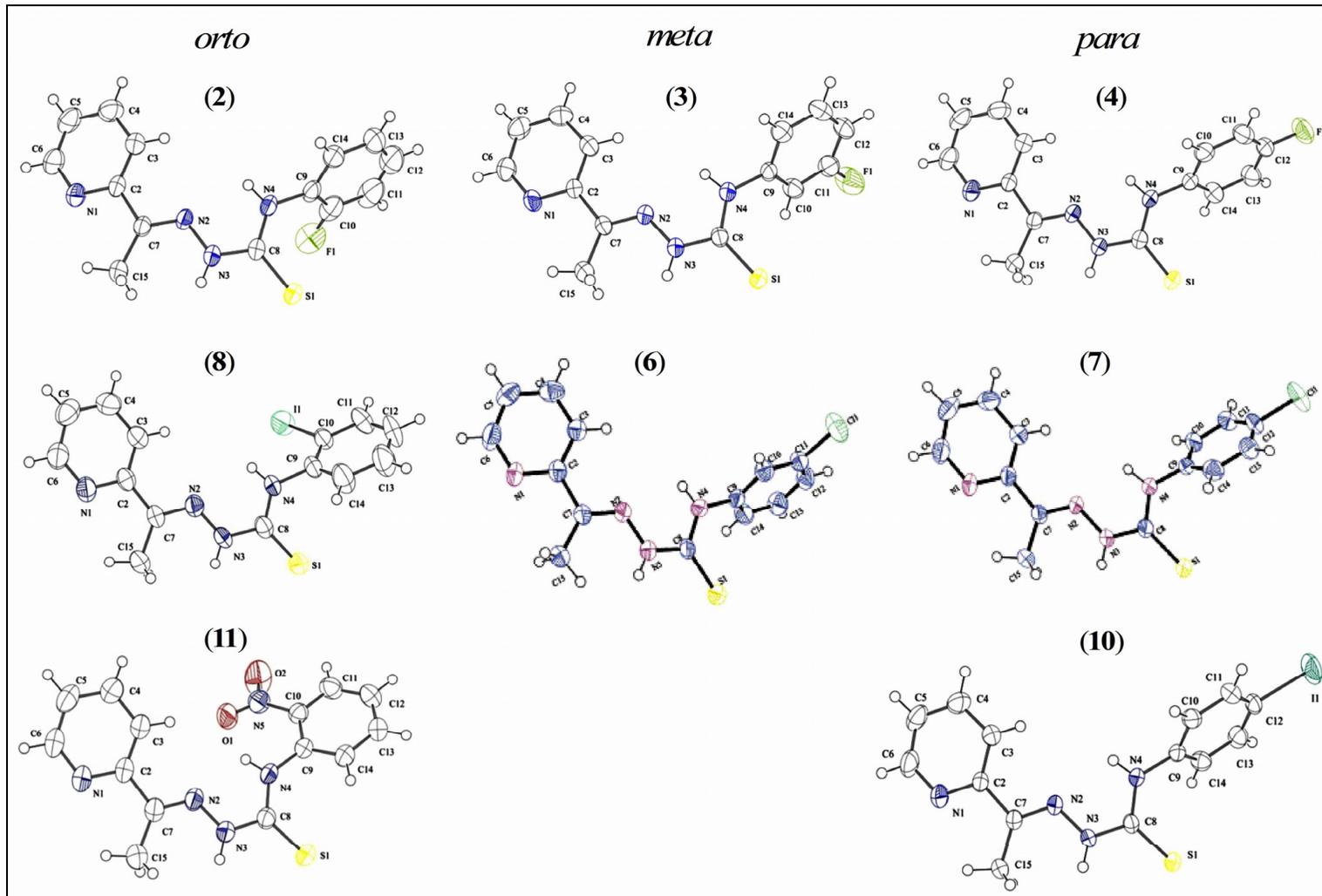


Figura 3.2.1. Diagramas ORTEP de H2Ac4*o*FPh (2), H2Ac4*m*FPh (3), H2Ac4*p*FPh (4), H2Ac4*m*ClPh (6), H2Ac4*p*ClPh (7), H2Ac4*o*IPh (8), H2Ac4*p*IPh (10) e H2Ac4*o*NO₂Ph (11).

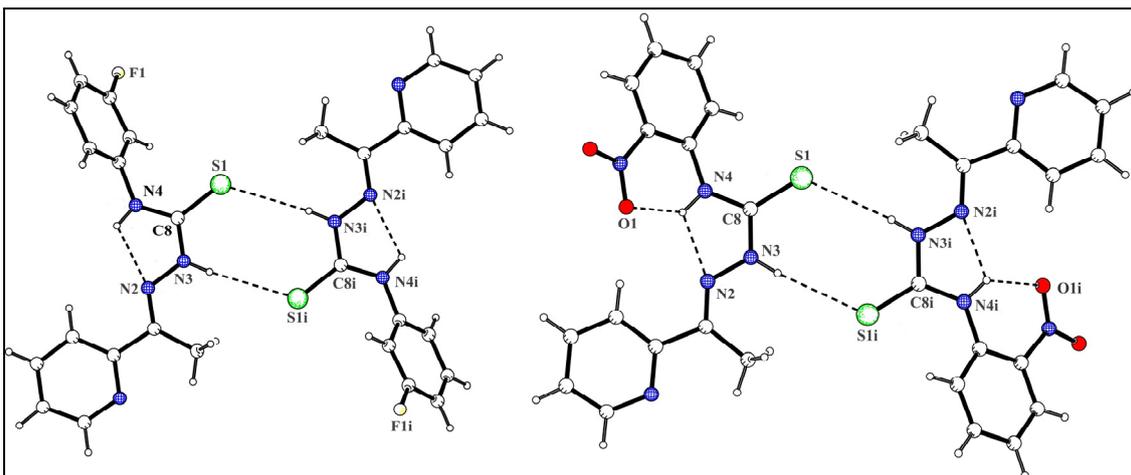


Figura 3.2.2. Empacotamento molecular de H₂Ac4*m*FPh (**3**, esquerda) e H₂Ac4*o*NO₂Ph (**11**, direita), evidenciando a ligação de hidrogênio intermolecular N(3)—H(3)···S(1).

A presença de ligação de hidrogênio intramolecular N(4)-H(4)···O(1) em H₂Ac4*o*NO₂Ph (**11**) é responsável pela diminuição da ligação N(4)-C(9) de 1,421(3) Å no composto não substituído **1** para 1,3973(19) Å em **11**. Além disso, foi observado aumento dos ângulos N(4)-C(8)-S(1), C(7)-N(2)-N(3) e C(8)-N(4)-C(9) do esqueleto da tiossemicarbazona em **11** em relação a **1**.

Tabela 3.2.1. Resumo da coleção de dados e refinamento de **2-4, 6-8, 10 e 11**

Composto	2	3	4	6	7	8	10	11	
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ FN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ IN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ N ₅ O ₂ S	
Massa molecular, g mol ⁻¹	288,34	288,34	288,34	304,79	304,79	396,24	396,24	315,35	
Difratômetro	Oxford	Oxford	Oxford	Oxford	Oxford	Oxford	Oxford	Oxford	
Comprimento de onda, Å	0,71073	0,71073	0,71073	1,54184	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073	
Temperatura, K	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	
Grupo de espaço	P 21/c	P -1	P -1	P 21/c	P 21/n	P 21/n	P 21/n	P 21/c	
Dimensões da Célula unitária	a, Å	5,4620(2)	5,8660(4)	5,8396(4)	10,4677(10)	10,3223(5)	11,3298(3)	10,4026(3)	11,3298(3)
	b, Å	10,5664(4)	10,1714(6)	10,2292(6)	5,6407(6)	5,7130(3)	7,5376(2)	5,6886(2)	7,5376(2)
	c, Å	24,1928(9)	12,0075(7)	11,8164(7)	24,518(3)	25,5526(13)	17,2904(5)	25,9488(6)	17,2904(5)
	α, °	90	75,061(5)	76,218(5)	90	90	90	90	90
	β, °	94,868(3)	85,873(5)	87,761(5)	100,183(11)	93,684(5)	98,910(3)	92,499(2)	98,910(4)
γ, °	90	89,139(5)	89,358(5)	90	90	90	90	90	
Volume, Å ³	1391,22(9)	690,42(7)	685,00(7)	1424,9(3)	1503,76(13)	1529,08(11)	1534,09(8)	1458,77(7)	
Z / Dens. calc. Mg m ⁻³	4 / 1,377	2 / 1,387	2 / 1,398	4 / 1,421	4 / 1,346	4 / 1,721	4 / 1,716	4 / 1,436	
Coef. de absorção, mm ⁻¹	0,239	0,241	0,243	3,697	0,388	2,226	2,219	0,237	
Correção de absorção	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	
F(000)	600	300	300	632	632	776	776	656	
Dimensões do cristal, mm	0,20x0,12x0,06	0,23x0,16x0,12	0,25x0,12x0,08	0,30x0,16x0,08	0,20x0,10x0,05	0,36x0,20x0,10	0,39x0,20x0,07	0,23x0,17x0,08	
Intervalo de θ, °	3,19 - 26,37	4,10 - 26,37	3,02 - 26,37	3,66 - 62,51	3,01 - 26,37	2,76 - 26,37	3,00 - 26,37	2,77 - 26,37	
Intervalo de hkl	-6 ≤ h ≤ 6	-7 ≤ h ≤ 6	-7 ≤ h ≤ 6	-12 ≤ h ≤ 12	-10 ≤ h ≤ 12	-15 ≤ h ≤ 14	-11 ≤ h ≤ 13	-14 ≤ h ≤ 13	
	-9 ≤ k ≤ 13	-12 ≤ k ≤ 11	-12 ≤ k ≤ 12	-5 ≤ k ≤ 6	-7 ≤ k ≤ 7	-5 ≤ k ≤ 5	-6 ≤ k ≤ 7	-9 ≤ k ≤ 9	
	-25 ≤ l ≤ 30	-14 ≤ l ≤ 11	-14 ≤ l ≤ 10	-27 ≤ l ≤ 28	-31 ≤ l ≤ 31	-34 ≤ l ≤ 34	-31 ≤ l ≤ 32	-20 ≤ l ≤ 21	
Reflexões medidas/únicas	10392 / 2834	4972 / 2809	5207 / 2804	7467 / 2251	6975 / 3055	9035 / 3120	13323 / 3120	11910 / 2987	
(R _{int})	(0,0605)	(0,0353)	(0,0278)	(0,0500)	(0,0405)	(0,0325)	(0,0598)	(0,0371)	
Completeza, %	99,9 (26,37°)	99,6 (26,37°)	99,9 (26,37°)	98,9 (62,51)	99,9 (26,35)	99,9 (26,37°)	99,9 (26,37°)	99,9 (26,37°)	
Dados/Restrições/parâmetros	2834 / 0 / 182	2809 / 0 / 182	2804 / 0 / 182	2251/0/181	3055/0/182	3120 / 0 / 182	3120 / 0 / 182	2966 / 0 / 200	
S	0,987	1,063	0,915	0,983	0,781	0,887	1,053	1,061	
R (obs/total)	0,0422 / 0,061	0,0480 / 0,0645	0,0379 / 0,0660	0,0398 / 0,0734	0,0385 / 0,1218	0,0371 / 0,1001	0,0392 / 0,0511	0,0369 / 0,0540	
wR (obs/total)	0,1155 / 0,1293	0,1425/0,1495	0,0846 / 0,0901	0,0854 / 0,0960	0,0631 / 0,0735	0,0625 / 0,0707	0,1096 / 0,1140	0,0990 / 0,1039	
Δρ min/Max, e Å ⁻³	0,300 / -0,326	0,598 / -0,279	0,219 / -0,178	-0,244/0,173	-0,176/0,176	0,607 / -0,706	1,066 / -1,246	0,161 / -0,206	

Tabela 3.2.2. Distâncias de ligação selecionadas (Å) de H2Ac4oFPh (2), H2Ac4mFPh (3), H2Ac4pFPh (4), H2Ac4mClPh (6), H2Ac4pClPh (7), H2Ac4oIPh (8), H2Ac4pIPh (10), H2Ac4oNO₂Ph (11), **1**¹⁰ e **5**¹¹

Átomos	1	2	3	4	5 ^a	6	7	8	10	11	
S(1)-C(8)	1,677(2)	1,6711(17)	1,671(2)	1,672(2)	1,654(3)	1,656(3)	1,669(3)	1,672(2)	1,665(3)	1,670(3)	1,6613(15)
C(2)-C(7)	1,486(2)	1,488(2)	1,487(3)	1,487(2)	1,474(4)	1,472(4)	1,487(4)	1,484(2)	1,473(4)	1,495(4)	1,497(2)
C(7)-C(15)	1,486(2)	1,489(3)	1,483(3)	1,494(2)	1,481(4)	1,484(4)	1,494(4)	1,488(2)	1,489(4)	1,483(4)	1,492(3)
N(2)-C(7)	1,284(3)	1,283(2)	1,287(3)	1,280(2)	1,281(3)	1,278(3)	1,290(3)	1,283(2)	1,285(4)	1,285(4)	1,278(2)
N(2)-N(3)	1,376(2)	1,3783(19)	1,371(2)	1,377(2)	1,362(3)	1,361(3)	1,378(3)	1,374(2)	1,368(4)	1,376(3)	1,3681(18)
N(3)-C(8)	1,358(3)	1,346(2)	1,359(3)	1,349(2)	1,359(3)	1,351(3)	1,354(3)	1,352(2)	1,361(4)	1,352(4)	1,361(2)
N(4)-C(8)	1,346(3)	1,343(2)	1,340(3)	1,342(2)	1,328(4)	1,336(4)	1,349(3)	1,341(2)	1,336(4)	1,347(4)	1,3514(19)
N(4)-C(9)	1,421(3)	1,412(3)	1,421(3)	1,428(2)	1,413(3)	1,421(3)	1,430(3)	1,423(2)	1,419(4)	1,417(4)	1,3973(19)
C-F(1)	-	1,347(3)	1,352(3)	1,362(2)	-	-	-	-	-	-	-
C-Cl(1)	-	-	-	-	1,679(11)	1,724(3)	1,741(3)	1,7411(19)	-	-	-
					1,800(14)						
C-I(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,088(3)	2,087(3)	-
C-N(5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,456(2)

^a Há duas moléculas de **5** na unidade assimétrica.

Tabela 3.2.3. Ângulos de ligação selecionados (°) de H2Ac4oFPh (2), H2Ac4mFPh (3), H2Ac4pFPh (4), H2Ac4mClPh (6), H2Ac4pClPh (7), H2Ac4oIPh (8), H2Ac4pIPh (10), H2Ac4oNO₂Ph (11), **1**¹⁰ e **5**¹¹

Átomos	1	2	3	4	5 ^a	6	7	8	10	11	
N(2)-N(3)-C(8)	118,9(2)	118,14(14)	118,67(17)	119,18(14)	118,2(2)	118,9(2)	119,0(2)	118,66(15)	119,1(3)	118,7(2)	118,23(13)
N(3)-C(8)-S(1)	119,7(1)	121,12(13)	119,93(15)	120,19(12)	121,0(2)	121,5(2)	121,2(2)	119,99(15)	120,7(2)	120,2(2)	120,70(11)
N(4)-C(8)-N(3)	114,8(2)	114,99(15)	114,43(17)	114,58(15)	114,7(2)	114,4(2)	114,4(2)	114,71(17)	114,9(3)	114,9(2)	112,28(13)
N(4)-C(8)-S(1)	125,5(2)	123,88(14)	125,60(15)	125,22(13)	124,3(2)	124,1(2)	124,3(2)	125,26(14)	124,5(2)	124,9(2)	126,99(13)
C(7)-N(2)-N(3)	118,8(2)	118,79(14)	118,37(18)	118,91(13)	119,1(2)	118,7(2)	118,7(2)	118,86(15)	118,9(3)	118,1(2)	121,28(14)
C(8)-N(4)-C(9)	127,6(2)	125,95(15)	127,40(17)	127,07(14)	125,1(3)	123,5(2)	125,4(2)	126,87(17)	125,2(3)	126,5(2)	129,92(13)

^a Há duas moléculas de **5** na unidade assimétrica.

Tabela 3.2.4. Ligações de hidrogênio nas estruturas de H₂Ac_{4o}FPh (2), H₂Ac_{4m}FPh (3), H₂Ac_{4p}FPh (4), H₂Ac_{4m}ClPh (6), H₂Ac_{4p}ClPh (7), H₂Ac_{4o}IPh (8), H₂Ac_{4p}IPh (10) e H₂Ac_{4o}NO₂Ph (11)

Composto	D—H···A	d(D—H) (Å)	d(H···A) (Å)	DHA (°)	d(D···A) (Å)
H ₂ Ac _{4o} FPh (2)	N(4)—H(4)···N(2)	0,86	2,16	108,6	2,568(2)
	N(3)—H(3)···S(1) [-x+2,-y+1,-z+1]	0,86	2,72	174,4	3,5798(16)
H ₂ Ac _{4m} FPh (3)	N(4)—H(4)···N(2)	0,86	2,16	109,5	2,580(2)
	N(3)—H(3)···S(1) [-x,-y+1,-z+2]	0,86	2,87	172,8	3,7215(18)
H ₂ Ac _{4p} FPh (4)	N(4)—H(4)···N(2)	0,86	2,16	110,1	2,583(2)
	N(3)—H(3)···S(1) [-x,-y+1,-z+1]	0,86	2,87	174,5	3,7289(15)
H ₂ Ac _{4m} ClPh (6)	N(3)—H(3)···S(1) [-x+1,-y+1,-z]	0,86	2,77	174,2	3,631(2)
H ₂ Ac _{4p} ClPh (7)	N(3)—H(3)···S(1) [-x,-y-2,-z-1]	0,86	2,80	173,6	3,655(2)
H ₂ Ac _{4o} IPh (8)	N(3)—H(3)···S(1) [-x+1,-y+1,-z]	0,86	2,78	171,0	3,635(3)
H ₂ Ac _{4p} IPh (10)	N(4)—H(4)···N(2)	0,86	2,17	109,1	2,586(3)
	N(3)—H(3)···S(1) [-x+1,-y+2,-z+1]	0,86	2,80	173,8	3,652(3)
H ₂ Ac _{4o} NO ₂ Ph (11)	N(4)—H(4)···N(2)	0,86	2,05	113,4	2,5208(19)
	N(3)—H(3)···S(1) [-x+1,-y+2,-z]	0,86	2,79	167,9	3,6383(14)
	N(4)—H(4)···O(1)	0,86	2,06	121,8	2,6137(17)

3.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS TIOSSEMICARBAZONAS 1-13

Atividade antimicrobiana

Foram testadas as atividades dos compostos **1-13** contra bactérias *gram*-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), bactérias *gram*-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e fungos *Candida albicans* (ATCC 10231) de acordo com o procedimento descrito na parte experimental¹². Os valores determinados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) das tiossemicarbazonas frente às cepas estão listados na Tabela 3.3.1, juntamente com os valores de CIM para os fármacos controle cloridrato de tetraciclina e fluconazol.

¹² 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.

Tabela 3.3.1. Concentração inibitória mínima (CIM) contra *S.aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* das tiossemicarbazonas **1-13** em comparação com cloridrato de tetraciclina e fluconazol

Composto	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
H2Ac4Ph (1)	97,1	45,0	14,6
H2Ac4oFPh (2)	119,1	> 115,6	20,8
H2Ac4mFPh (3)	89,3	187,3	20,4
H2Ac4pFPh (4)	91,9	>343,3	20,6
H2Ac4oClPh (5)	>67,6	> 66,3	21,0
H2Ac4mClPh (6)	68,3	141,1	15,2
H2Ac4pClPh (7)	42,7	111,5	17,0
H2Ac4oIPh (8)	24,9	> 131,2	20,0
H2Ac4mIPh (9)	98,4	> 85,8	13,7
H2Ac4pIPh (10)	66,0	>85,8	10,7
H2Ac4oNO ₂ Ph (11)	63,4	> 64,1	13,9
H2Ac4mNO ₂ Ph (12)	134,8	117,3	11,6
H2Ac4pNO ₂ Ph (13)	82,4	>164,9	10,7
cloridrato de tetraciclina	0,3	30,4	-
Fluconazol	-	-	24,7

As cepas apresentaram diferentes sensibilidades frente às tiossemicarbazonas. As bactérias *gram*-positivas *S. aureus* foram mais sensíveis a **1-13** do que as bactérias *gram*-negativas *P. aeruginosa*. A maioria dos compostos substituídos foi mais ou tão ativa quanto H2Ac4Ph (**1**) frente a *S. aureus*. H2Ac4oIPh (**8**) foi o composto mais potente, cuja atividade foi cerca de quatro vezes maior do que a do composto **1**.

Todos os compostos foram mais ativos frente a *C. albicans* do que o fármaco controle. Os compostos **9-13** foram mais ativos do que **1**. Por outro lado, a presença dos grupos substituintes flúor e cloro resultou em diminuição da atividade dos compostos **2-7** em relação a **1**.

Atividade citotóxica

Inicialmente foi avaliada a atividade contra células de glioblastoma multiforme (GBM) de H2Ac4Ph (**1**) e de seus derivados H2Ac4oClPh (**5**), H2Ac4mClPh (**6**), H2Ac4pClPh (**7**) em comparação com a atividade, estudada anteriormente, de *N(4)-o*-toluil- (H2Ac4oT, **14**), *N(4)-m*-toluil- H2Ac4mT (**15**) e *N(4)-p*-toluil- H2Ac4pT (**16**) 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas ¹¹.

No presente estudo foi investigada a atividade citotóxica de **1, 5-7** e **14-16** contra células de GBM RT2, que expressa a proteína pró-apoptótica p53, e T98G, que expressa a proteína p53 mutante. As concentrações dos compostos que inibem o crescimento de 50% das células (CI₅₀) RT2 e T98G são apresentadas na Tabela 3.3.2, juntamente com a atividade hemolítica das tiossemicarbazonas.

Tabela 3.3.2. Efeito citotóxico (CI₅₀) contra células RT2 e T98G e atividade hemolítica de H2Ac4Ph (**1**) e de seus derivados H2Ac4oClPh (**5**), H2Ac4mClPh (**6**), H2Ac4pClPh (**7**), H2Ac4oT (**14**), H2Ac4mT (**15**) e H2Ac4pT (**16**)

Compostos	CI ₅₀ (mol L ⁻¹)		Atividade hemolítica (mol L ⁻¹)
	RT2 (p53)	T98G (p53 mutante)	
(1)	1,4 x 10 ⁻⁹ ± 8,0 x 10 ⁻¹⁰	6,8 x 10 ⁻⁹ ± 8,3 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻³
(5)	1,4 x 10 ⁻⁹ ± 3,0 x 10 ⁻¹⁰	1,1 x 10 ⁻⁹ ± 0,96 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻³
(6)	9 x 10 ⁻⁹ ± 3 x 10 ⁻⁹	1,0 x 10 ⁻⁹ ± 4,0 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻³
(7)	3,7 x 10 ⁻⁹ ± 2,0 x 10 ⁻¹⁰	5,9 x 10 ⁻⁹ ± 7,6 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻³
(14)	1,4 x 10 ⁻⁸ ± 7,0 x 10 ⁻⁹	3,4 x 10 ⁻⁸ ± 3,0 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻³
(15)	2,4 x 10 ⁻⁸ ± 1,2 x 10 ⁻⁸	5,0 x 10 ⁻⁸ ± 1,8 x 10 ⁻⁸	> 10 ⁻³
(16)	1,7 x 10 ⁻⁸ ± 1,1 x 10 ⁻⁸	3,7 x 10 ⁻⁸ ± 3 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻³
Cisplatina	17 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁶	-

Todas as tiossemicarbazonas foram ativas em doses nanomolares contra células RT2 e T98G, apresentando atividade 100-1000 vezes superior à da cisplatina. Os compostos com o substituinte cloro (**5-7**) foram mais ativos contra as duas linhagens celulares do que os compostos contendo o grupo toluil (**14-16**). A presença do grupo substituinte metil no anel fenila em **14-16** resultou na diminuição da atividade contra RT2 e T98G em relação ao composto **1**. A substituição por cloro, por sua vez, resultou em maior atividade de **5-7** frente a células T98G em relação a **1**.

Em geral as células RT2 foram mais sensíveis às tiossemicarbazonas do que as células T98G. Entretanto, o composto **6** foi mais ativo contra células T98G do que contra células RT2. O comportamento apresentado pelo composto **6** é interessante, uma vez que estudos prévios do genótipo da proteína p53 e de sensibilidade de linhagens de células cancerígenas humanas a fármacos antitumorais revelaram que células que não contêm a proteína p53 ou que apresentam a proteína p53 mutante são menos sensíveis à maioria dos fármacos clinicamente utilizados que as células que expressam essa proteína¹³.

O teste de atividade hemolítica foi utilizado para avaliar o potencial dos compostos em romper a membrana de células vermelhas do sangue. As tiossemicarbazonas apresentaram baixa atividade hemolítica (CI₅₀ > 10⁻³ mol L⁻¹), sugerindo que o rompimento da membrana celular não é o mecanismo pelo qual essas moléculas induzem morte das células. Por outro lado, modificações fenotípicas significativas ocorreram nas células de GBM após a exposição às tiossemicarbazonas. Foram verificadas alterações morfológicas, como encolhimento e arredondamento das células e formação de corpos apoptóticos. Além disso, as células exibiram o ADN fragmentado. Esses fatores sugerem que as células sofrem morte por apoptose.

¹³ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

A presença do cloro no anel fenílico em **5-7** resultou em aumento da atividade em relação a **1** contra T98G, levando à investigação da atividade citotóxica de tiossemicarbazonas substituídas em *N(4)*-fenil pelos halogênios flúor e iodo. Além disso, como a presença de grupo metil, que é doador indutivo de elétrons para o grupo fenil, reduziu a atividade em reação a **1**, também foi investigado o efeito do substituinte nitro, um grupo retirador de elétrons, na atividade citotóxica das tiossemicarbazonas.

A atividade citotóxica dos compostos **1-13** foi investigada contra linhagens de GBM U87 (que expressa proteína p53), T98G (que expressa proteína p53 mutante) e contra a linhagem de câncer de mama MCF-7 (Tabela 3.3.3).

Tabela 3.3.3. Efeito citotóxico (CI₅₀) contra células T98G, U87 e MCF-7 e atividade hemolítica de **1-13** em comparação com etoposídeo

Composto	CI ₅₀ (mol L ⁻¹)			
	T98G (p53 mutante)	U87 (p53)	MCF-7	Atividade hemolítica
H2Ac4Ph (1)	6,8 x 10 ⁻⁹ ± 8,3 x 10 ⁻¹⁰	1,4 x 10 ⁻⁹ ± 3,9 x 10 ⁻¹⁰	1,8 x 10 ⁻¹⁰ ± 6,1 x 10 ⁻¹¹	> 10 ⁻⁵
H2Ac4oFPh (2)	3,1 x 10 ⁻⁹ ± 2,2 x 10 ⁻⁹	5,0 x 10 ⁻⁹ ± 4,7 x 10 ⁻¹⁰	3,9 x 10 ⁻¹⁰ ± 2,3 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵
H2Ac4mFPh (3)	1,2 x 10 ⁻⁸ ± 5,4 x 10 ⁻⁹	1,8 x 10 ⁻⁸ ± 1,7 x 10 ⁻⁹	9,0 x 10 ⁻⁹ ± 2,0 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻⁵
H2Ac4pFPh (4)	1,7 x 10 ⁻⁸ ± 1,9 x 10 ⁻⁹	1,0 x 10 ⁻⁸ ± 1,0 x 10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁻⁹ ± 7,3 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵
H2Ac4oClPh (5)	1,1 x 10 ⁻⁹ ± 0,96 x 10 ⁻⁹	2,6 x 10 ⁻⁹ ± 2,1 x 10 ⁻⁹	1,6 x 10 ⁻¹⁰ ± 1,4 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵
H2Ac4mClPh (6)	1,0 x 10 ⁻⁹ ± 0,4 x 10 ⁻⁹	3,1 x 10 ⁻⁸ ± 9,6 x 10 ⁻⁹	2,4 x 10 ⁻⁸ ± 1,5 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻⁵
H2Ac4pClPh (7)	5,9 x 10 ⁻⁹ ± 7,6 x 10 ⁻¹⁰	1,7 x 10 ⁻⁹ ± 8,2 x 10 ⁻¹⁰	8,5 x 10 ⁻⁹ ± 4,14 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵
H2Ac4oIPh (8)	8,1 x 10 ⁻⁹ ± 4,2 x 10 ⁻⁹	6,1 x 10 ⁻⁹ ± 2,1 x 10 ⁻⁹	4,1 x 10 ⁻⁹ ± 1,9 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻⁵
H2Ac4mIPh (9)	6,1 x 10 ⁻⁸ ± 2,5 x 10 ⁻⁸	8,4 x 10 ⁻⁸ ± 1,0 x 10 ⁻⁸	4,5 x 10 ⁻⁸ ± 3,7 x 10 ⁻⁸	> 10 ⁻⁵
H2Ac4pIPh (10)	6,4 x 10 ⁻⁸ ± 3,6 x 10 ⁻⁸	5,9 x 10 ⁻⁸ ± 3,7 x 10 ⁻⁸	6,6 x 10 ⁻⁹ ± 3,2 x 10 ⁻⁹	> 10 ⁻⁵
H2Ac4oNO ₂ Ph (11)	6,6 x 10 ⁻⁹ ± 3,3 x 10 ⁻⁹	4,3 x 10 ⁻⁹ ± 8,2 x 10 ⁻¹⁰	5,7 x 10 ⁻⁹ ± 1,9 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵
H2Ac4mNO ₂ Ph (12)	1,4 x 10 ⁻⁷ ± 1,1 x 10 ⁻⁷	6,9 x 10 ⁻⁸ ± 7,1 x 10 ⁻⁹	3,8 x 10 ⁻⁸ ± 3,2 x 10 ⁻⁸	> 10 ⁻⁵
H2Ac4pNO ₂ Ph (13)	1,4 x 10 ⁻⁷ ± 1,1 x 10 ⁻⁸	1,6 x 10 ⁻⁷ ± 5,6 x 10 ⁻⁸	5,2 x 10 ⁻⁸ ± 2,1 x 10 ⁻⁸	> 10 ⁻⁵
etoposídeo	4,6 x 10 ⁻⁷ ± 2,5 x 10 ⁻⁸	6,2 x 10 ⁻⁷ ± 1,5 x 10 ⁻⁷	4,8 x 10 ⁻⁷ ± 7,0 x 10 ⁻⁸	-

As tiossemicarbazonas **1-13** foram altamente ativas contra as células T98G, U87 e MCF-7, apresentando atividades superiores ao controle etoposídeo. As células de tumor mamário foram mais sensíveis aos compostos do que as células de GBM. Entretanto, não há diferenças significativas entre a sensibilidade das células T98G e U87 frente a **1-13**, sugerindo que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas pode ocorrer por vias que independem da proteína pró-apoptótica p53.

Em algumas situações, a presença de substituintes no grupo *N(4)*-fenil resultou em compostos mais ou tão ativos quanto **1**. Além disso, verificou-se que os derivados que contêm substituintes na posição *orto* foram mais ativos do que seus isômeros de posição *meta* e *para*.

As tiossemicarbazonas apresentam baixa atividade hemolítica ($CI_{50} > 10^{-5}$ mol L⁻¹), sugerindo que o rompimento da membrana celular não é o mecanismo pelo qual esses compostos induzem morte das células. A baixa toxicidade contra hemácias também sugere que os compostos apresentam bom índice terapêutico.

Cálculos teóricos: estudo da relação estrutura-atividade (SAR)

Foram realizados cálculos teóricos com o objetivo de obter propriedades estereo-eletrônicas das tiossemicarbazonas. Em seguida, foi feito um estudo de relação estrutura-atividade (structure-activity relationship, SAR), para identificar as propriedades que poderiam estar envolvidas com a atividade citotóxicas desses compostos.

As seguintes propriedades estereo-eletrônicas foram utilizadas como descritores: área superficial, HOMO, LUMO, logP¹⁴ dipolo e cargas parciais atômicas dos átomos potencialmente coordenantes enxofre, nitrogênio piridínico (N_{py}) e nitrogênio imínico (N_{im}). A área superficial pode fornecer dados sobre características espaciais necessárias para interação molécula-receptor. Valores de logP e dipolo podem fornecer informações sobre a lipofilia das moléculas. Energias de orbitais HOMO e LUMO estão relacionadas com potencial de ionização e afinidade eletrônica, respectivamente. Esses orbitais de fronteira também estão associados com a reatividade das moléculas.

Valores experimentais de pCI₅₀ (-log CI₅₀) em células T98G, U87 e MCF-7 e de propriedades estereo-eletrônicas calculadas de **1-13** são apresentados na Tabela 3.3.4. Para o estudo de SAR, foram construídas matrizes de correlação entre propriedades estereo-eletrônicas e atividade citotóxica de ambos os isômeros *E* e *Z* de **1-13** (Tabela 3.3.5)

Com relação aos isômeros *E*, há correlações similares entre os descritores e a atividade contra células U87 e MCF-7. No entanto, há diferentes correlações entre os descritores e atividade contra células U87 (que expressam p53) e células T98G (que expressam p53 mutante). Embora ambas as linhagens sejam de GBM, o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas deve ser diferente nas duas linhagens. Foram observadas correlações razoáveis entre atividade contra células U87 e MCF-7 e a área da superfície molecular (R = -0,71 e -0,60, respectivamente), a energia do orbital HOMO (R = 0,69 e 0,67, respectivamente) e a carga parcial do enxofre (R = 0,71 e 0,68, respectivamente). Assim, quanto menor a área superficial das tiossemicarbazonas, maior a atividade. Essa correlação está de acordo com a observação de que isômeros *orto* são mais citotóxicos do que seus isômeros de posição *meta* e *para*.

¹⁴ Programa ALOGPS 2.1. Disponível em: <http://www.vcclab.org/lab/alogps> (acessado em abril de 2011).

A correlação direta entre energia de orbital HOMO e atividade contra células U87 e MCF-7 é um resultado interessante, uma vez que energia de orbital HOMO está relacionada com a reatividade das moléculas. Além disso, a correlação direta entre citotoxicidade e carga parcial do enxofre sugere que quanto mais negativamente carregado o átomo de enxofre, maior a atividade das tiossemicarbazonas contra U87 e MCF-7. Vale salientar que há correlação entre energia de HOMO e carga parcial do enxofre ($R = 0,90$). Assim, o átomo de enxofre poderia ter um papel importante na reatividade das tiossemicarbazonas, e, portanto em sua atividade citotóxica.

Distribuição das densidades HOMO para os isômeros *E* de **1-13** (Figura 3.3.1) apresentam distintas deslocalizações eletrônicas, as quais poderiam parcialmente contribuir para a diferença na atividade biológica desses compostos, embora outros parâmetros não possam ser excluídos.

No que se refere à correlação entre as propriedades dos isômeros *E* de **1-13** e suas atividades contra células T98G, observamos apenas uma correlação inversa entre citotoxicidade e área da superfície molecular ($R = -0,60$).

As mesmas correlações encontradas para os isômeros *E* também foram observadas para os isômeros *Z*. Porém adicionalmente, as atividades dos isômeros *Z* estão correlacionadas à energia do orbital LUMO ($R = 0,63$) e ao dipolo ($R = 0,62$).

Tabela 3.3.4. Valores experimentais de pCI₅₀ (-log CI₅₀) contra células T98G, U87 e MCF-7 e de propriedades calculadas de **1-13**

Composto	pCI ₅₀ MCF-7	pCI ₅₀ T98G	pCI ₅₀ U87	Área superficial (Å)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	LogP	Dipolo (D)	Carga (u. e.) ^a			
									N _{pv}	N _{azo}	S	
Isômeros <i>E</i>	1	9,745	8,167	8,854	365,315	-8,171	1,690	3,100	5,281	-0,484	-0,296	-0,200
	2	9,409	8,509	8,301	371,197	-8,307	1,650	3,220	4,211	-0,485	-0,296	-0,198
	3	8,046	7,921	7,745	372,401	-8,400	1,520	3,240	4,496	-0,484	-0,297	-0,193
	4	8,921	7,770	8,000	372,370	-8,283	1,536	3,230	5,795	-0,483	-0,297	-0,201
	5	9,796	8,959	8,585	380,124	-8,346	1,621	3,670	3,877	-0,485	-0,293	-0,196
	6	7,620	9,000	7,509	382,152	-8,416	1,509	3,650	4,374	-0,484	-0,298	-0,192
	7	8,071	8,229	8,770	382,175	-8,304	1,492	3,650	6,042	-0,483	-0,298	-0,195
	8	8,387	8,092	8,215	390,191	-8,332	1,612	3,780	4,437	-0,485	-0,290	-0,196
	9	7,347	7,215	7,076	391,944	-8,407	1,510	3,790	4,651	-0,484	-0,297	-0,193
	10	8,180	7,194	7,229	391,979	-8,220	1,483	3,800	5,788	-0,483	-0,297	-0,195
	11	8,244	8,180	8,367	402,386	-8,370	0,840	3,170	1,826	-0,489	-0,287	-0,192
	12	7,420	6,854	7,161	406,617	-8,602	1,225	3,170	4,174	-0,484	-0,300	-0,188
	13	7,284	6,854	6,796	406,613	-8,688	1,096	3,180	7,978	-0,483	-0,299	-0,178
Isômeros <i>Z</i>	1	9,745	8,167	8,854	364,729	-7,916	1,466	3,100	6,968	-0,503	-0,290	-0,201
	2	9,409	8,509	8,301	370,528	-8,063	1,469	3,220	6,024	-0,503	-0,288	-0,201
	3	8,046	7,921	7,745	371,803	-8,152	1,371	3,240	7,161	-0,503	-0,291	-0,194
	4	8,921	7,770	8,000	371,781	-8,030	1,395	3,230	8,186	-0,503	-0,291	-0,203
	5	9,796	8,959	8,585	379,517	-8,107	1,448	3,670	5,864	-0,503	-0,286	-0,196
	6	7,620	9,000	7,509	381,567	-8,169	1,359	3,650	7,277	-0,503	-0,292	-0,194
	7	8,071	8,229	8,770	381,574	-8,060	1,352	3,650	8,704	-0,503	-0,292	-0,197
	8	8,387	8,092	8,215	389,019	-8,119	1,437	3,780	6,278	-0,503	-0,283	-0,194
	9	7,347	7,215	7,076	391,345	-8,160	1,358	3,790	7,231	-0,503	-0,291	-0,195
	10	8,180	7,194	7,229	391,425	-7,998	1,343	3,800	8,103	-0,503	-0,291	-0,196
	11	8,244	8,180	8,367	403,070	-8,258	1,078	3,170	4,617	-0,504	-0,279	-0,190
	12	7,420	6,854	7,161	406,006	-8,390	1,228	3,170	8,250	-0,504	-0,293	-0,190
	13	7,284	6,854	6,796	405,998	-8,473	1,077	3,180	11,486	-0,504	-0,292	-0,179

^a Valores de cargas parciais expressas em unidades eletrostáticas (u. e.).

Tabela 3.3.5. Matrizes de correlação entre propriedades estéreo-eletrônicas e atividades citotóxicas de tiossemicarbazonas **1-13**

Isômero <i>E</i>												
	MCF7	T98G	U87	Área superficial (3D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ALOGPs	Dipolo (D)	Carga ^a (u. e.)			
									N ^b _{py}	N ^c _{im}	S	
MCF7	1,00											
T98	0,59	1,00										
U87	0,78	0,71	1,00									
Surface Área(3D)	-0,71	-0,60	-0,60	1,00								
HOMO (eV)	0,69	0,48	0,67	-0,71	1,00							
LUMO (eV)	0,53	0,40	0,34	-0,79	0,59	1,00						
ALOGPs	-0,16	0,16	-0,09	0,07	0,24	0,37	1,00					
Dipolo (D)	-0,21	-0,45	-0,35	0,00	-0,20	0,17	0,02	1,00				
Carga (N _{py})	0,25	0,36	0,40	0,20	0,14	-0,47	-0,15	-0,81	1,00			
Carga (N _{im})	-0,35	-0,41	-0,50	-0,09	-0,31	0,26	-0,08	0,67	-0,90	1,00		
Carga (S)	0,71	0,52	0,68	-0,78	0,90	0,68	0,16	-0,31	0,11	-0,24	1,00	
Isômero <i>Z</i>												
	MCF7	T98G	U87	Área superficial (3D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ALOGPs	Dipolo (D)	Carga ^a (u.e.)			
									N ^b _{py}	N ^c _{im}	S	
MCF7	1,00											
T98	0,59	1,00										
U87	0,78	0,71	1,00									
Surface Área(3D)	-0,70	-0,59	-0,59	1,00								
HOMO (eV)	0,68	0,47	0,62	-0,81	1,00							
LUMO (eV)	0,63	0,50	0,47	-0,83	0,81	1,00						
ALOGPs	-0,16	0,16	-0,09	0,06	0,27	0,34	1,00					
Dipolo (D)	-0,49	-0,27	-0,37	0,15	0,21	0,06	0,74					
Carga (N _{py})	-0,50	-0,62	-0,57	0,28	-0,39	-0,34	-0,09	1,00				
Carga (N _{azo})	-0,72	-0,59	-0,67	0,85	-0,95	-0,85	-0,25	0,54	1,00			
Carga (S)	-0,34	-0,40	-0,47	-0,15	-0,03	0,12	-0,03	0,76	0,18	1,00		
MCF7	0,70	0,48	0,61	-0,83	0,91	0,84	0,11	-0,47	-0,88	-0,01	1,00	

^a As cargas atômicas estão expressas em módulo de unidades eletrostáticas (u. e.)

^b N_{py}: nitrogênio piridínico.

^c N_{im}: nitrogênio do grupo imínico.

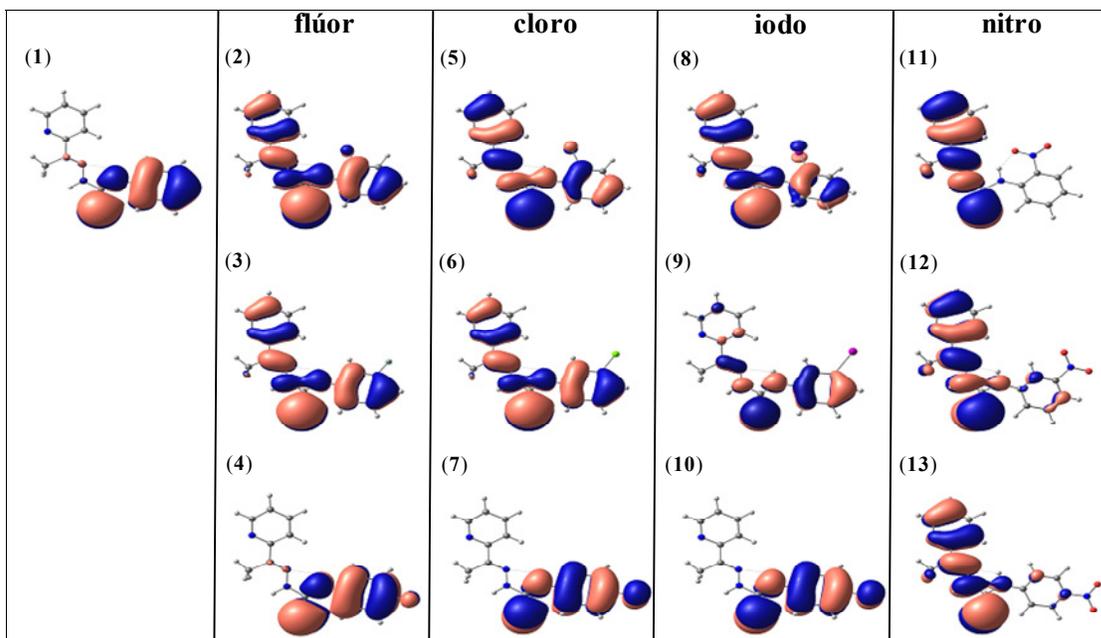


Figura 3.3.1. Distribuição das densidades HOMO para 1 -13. Valor de contorno: 0,018.

Análise morfológica das células tumorais

Modificações morfológicas significativas ocorreram nas células T98G, U87 e MCF-7 quando expostas às tiossemicarbazonas 1-13. Foram verificados encolhimento e arredondamento das células e formação de corpos apoptóticos, os quais são característicos de morte celular por apoptose. Na Figura 3.3.2, por exemplo, podem ser observadas as diferenças morfológicas das células T98G, U87 e MCF-7 tratadas com 2 em relação às células controle.

Células controle apresentam o ADN intacto, porém as células expostas às tiossemicarbazonas apresentam o ADN fragmentado. Na Figura 3.3.3 é possível observar condensação da cromatina e fragmentação do ADN, características de apoptose, de células MCF-7, T98G e U87 tratadas 2 em relação às células controle. Os resultados sugerem, portanto, que a redução da sobrevivência celular após a exposição às tiossemicarbazonas 1-13 pode ter ocorrido, dentre outros motivos, devido à capacidade das tiossemicarbazonas em induzir apoptose.

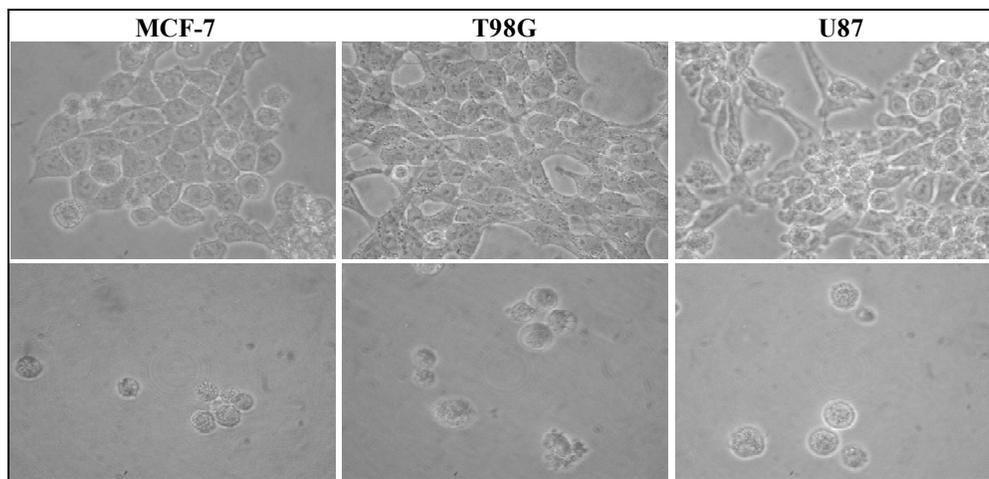


Figura 3.3.2. Fotografia obtida em microscópio contraste de fase de células MCF-7, T98G e U87 controle (acima) e tratadas (abaixo) com **2** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 h. Ampliação: 400x.

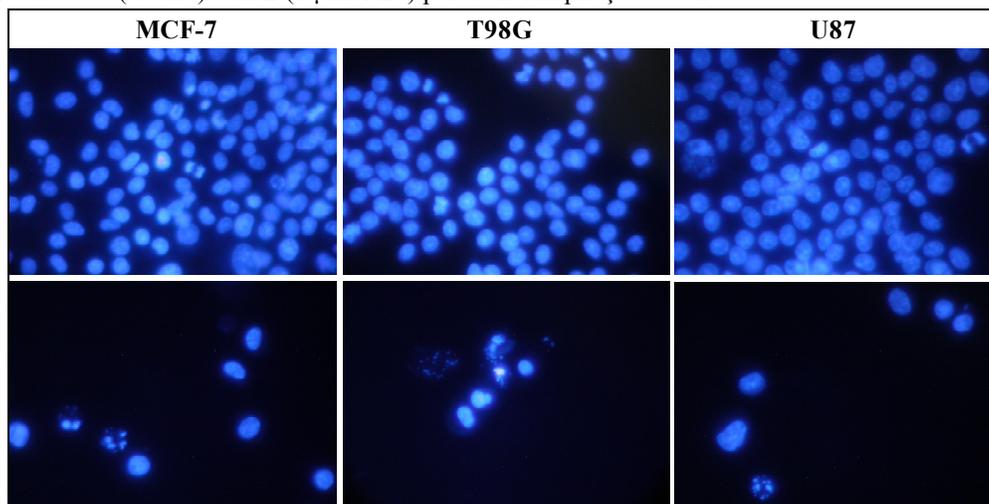


Figura 3.3.3. Fotografia obtida em microscópio de fluorescência de células MCF-7, T98G e U87 controle (acima) e tratadas com **2** (abaixo) na presença do marcador DAPI. Células expostas a **2** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 h apresentam fragmentação do ADN em comparação às células controle.

Ensaio de coloração simultânea com brometo de etídio e laranja de acridina

Embora o uso do marcador DAPI seja um ensaio comumente utilizado para determinação de apoptose, este método não assinala outros tipos de morte celular. Para complementar o ensaio com DAPI, foi utilizado o ensaio de coloração celular simultânea com os intercalantes de ADN brometo de etídio/laranja de acridina, os quais podem ser utilizados para diferenciar células vivas, apoptóticas e necróticas. Além disso, a coloração com laranja de acridina é útil para identificar vacúolos citoplasmáticos característicos de autofagia.

O corante brometo de etídio penetra somente em células que apresentam a membrana danificada, e interage com o ADN, emitindo fluorescência verde. O corante laranja de acridina, por sua vez, penetra em células intactas e interage com o ADN desnaturado, emitindo fluorescência vermelha, ou com o ADN de fita dupla, emitindo fluorescência verde. Este corante também se acumula em organelas com ambiente ácido, emitindo fluorescência

vermelha. Uma vez que autofagia caracteriza-se, dentre outros, por formação de vacúolos ácidos (vacúolos autofágicos), o corante laranja de acridina tem sido utilizado para determinação desse tipo de morte celular.

Células controle apresentaram o núcleo verde homogêneo e mínima fluorescência vermelha, típica de células viáveis. Por outro lado, células tratadas com **1-13** apresentaram condensação da cromatina e ausência da fluorescência proveniente do brometo de etídio, indicando que a membrana se encontra preservada. As células também apresentaram grandes compartimentos ácidos no citoplasma, os quais seriam provavelmente autofagossomos. O resultado sugere que as células expostas a **1-13** sofrem morte celular por apoptose e autofagia. Entretanto, testes mais específicos são necessários para confirmar esta hipótese.

Na Figura 3.3.4 é possível observar células MCF-7, T98G e U87 controle e tratadas com **2**, coradas com brometo de etídio e laranja de acridina.

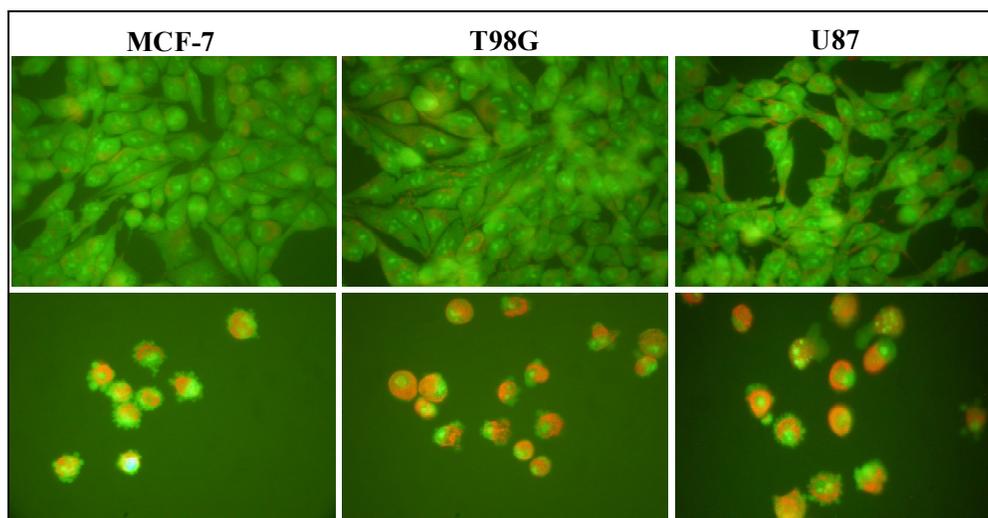


Figura 3.3.4. Fotografia obtida em microscópio de fluorescência de células MCF-7, T98G e U87 controle (acima) e tratadas com **2** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) (abaixo) na presença de brometo de etídio e laranja de acridina.

Efeito sobre a polimerização da tubulina

Compostos que provocam alterações na dinâmica de polimerização dos microtúbulos desencadeiam sinais bioquímicos que culminam em apoptose ¹⁵. A tubulina, principal constituinte de microtúbulos, é um dos alvos de fármacos antitumorais ou de fármacos que apresentam atividade citotóxica, como a colchicina, o taxol e a vincristina.

Uma vez que as tiossemicarbazonas **1-13** induzem apoptose, investigamos se o mecanismo apoptótico está relacionado à inibição da polimerização da tubulina e/ou ao comprometimento da estabilização dos microtúbulos. Devido à similaridade estrutural de **1-13**, foi escolhido apenas um composto para estudo de interação com tubulina. Dessa forma, a tubulina foi incubada com H2Ac4pCℓPh (**7**) e com o controle colchicina. A colchicina inibiu completamente a polimerização da tubulina a $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que **7** promoveu parcial

¹⁵ M.A. Jordan, L. Wilson, Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 253–265.

inibição de polimerização nas concentrações de 5 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 3.3.5). Portanto, embora **7** promova a inibição da polimerização da tubulina em altas doses em comparação com a colchicina, esta proteína pode ser um dos alvos biológicos das tiossemicarbazonas.

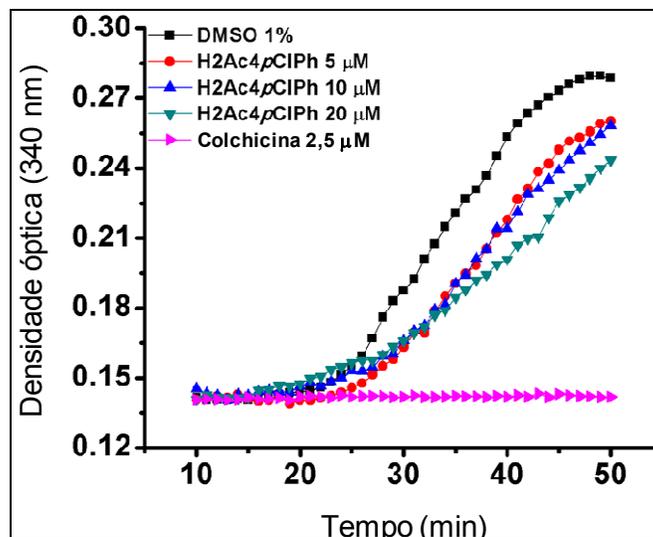


Figura 3.3.5. Inibição *in vitro* de polimerização da tubulina promovida por H2Ac4pCℓPh (**7**) e colchicina.

Análise multiparamétrica para interrupção de mitose

Agentes que interagem com microtúbulos geralmente comprometem a sua organização e provocam interrupção do ciclo celular. O fato de **7** aparentemente ter inibido a polimerização *in vitro* da tubulina purificada motivou a investigação da capacidade desse composto em interferir na organização de microtúbulos celulares e em promover a interrupção do processo mitótico de células HeLa (câncer cervical). Foi realizada análise multiparamétrica para interrupção de mitose, a qual é um conjunto de análises de marcação de tubulina e fosfohistona H3, com contra-coloração do núcleo com Hoechst 33342. Os parâmetros avaliados foram: densidade celular (número de células vivas por unidade de volume), condensação nuclear, densidade de microtúbulos (determinado pela intensidade média de tubulina marcada por área) e índice mitótico (número de células em mitose - verificadas pelo marcador de fosfohistona H3 - dividido pelo número total de células). A marcação de tubulina permite averiguar a organização dos microtúbulos nas células. A marcação de fosfohistona H3 fosforilada permite avaliar se **7** induz interrupção do ciclo celular durante a mitose, uma vez que esta proteína é fosforilada somente nessa fase do ciclo celular. Dessa forma, quanto maior o número de células que contêm fosfohistona H3 fosforilada, maior a capacidade de um composto em induzir a interrupção da mitose. A marcação do núcleo com o corante Hoechst 33342 possibilita obtenção de informação sobre densidade celular e condensação nuclear.

Mudanças fenotípicas celulares promovidas por colchicina e **7** em relação ao controle são apresentadas na Figura 3.3.6. Na Tabela 3.3.6 encontram-se os resultados de análise paramétrica do potencial de colchicina e **7** em promover interrupção de mitose. Foram

determinados valores de CI_{50} para a citotoxicidade frente a células HeLa de **7** e colchicina, enquanto que seu o efeito sobre condensação de cromatina, densidade de microtúbulos e índice mitótico foi avaliado pela determinação da concentração dos compostos que promove o mínimo efeito detectável (“minimum detectable effect”, MDEC).

As células controle apresentam os microtúbulos altamente organizados e baixa porcentagem de células mitóticas. Células tratadas com colchicina e **7** apresentaram condensação nuclear e alteração dos microtúbulos. Na presença de **7** na concentração de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, o núcleo se encontrava condensado e fragmentado, o qual é característico de apoptose. Ao contrário da colchicina, **7** não induziu aumento da porcentagem de células com fosfohistona H3. Portanto, apesar de inibir parcialmente a polimerização da tubulina em concentrações micromolares e de induzir desorganização dos microtúbulos, a tiossemicarbazona **7** não causa a interrupção do processo mitótico. Consequentemente, a interação direta com microtúbulos provavelmente não é o principal mecanismo de indução de apoptose das tiossemicarbazonas.

Embora apresente atividade citotóxica contra células MCF-7, T98G e U87 em concentrações nanomolares, foi necessária concentração micromolar de **7** para promover o mesmo efeito em células HeLa. Não há possibilidade de fazer comparação da sensibilidade de células HeLa com as demais células MCF-7, T98G e U87, uma vez que as condições dos testes foram diferentes.

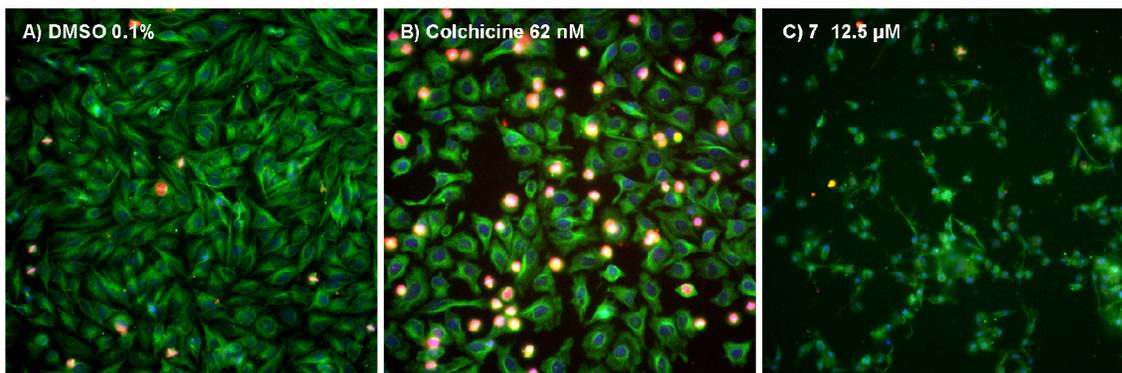


Figura 3.3.6. Imunofluorescência para detecção de células HeLa em mitose. Células HeLa foram tratadas com veículo (controle DMSO 0,1 %), (b) colchicina (62 nmol L^{-1}) ou (c) **7** ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), seguida por marcação simultânea de α -tubulina (verde), fosfohistona H3 (vermelho) e do núcleo (azul). Ampliação: 200x.

Tabela 3.3.6. Resultado de análise multiparamétrica de interrupção de mitose por colchicina e **7** em células HeLa

Composto	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) Densidade celular	MDEC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
		Condensação nuclear	Densidade de microtúbulos	Índice mitótico
Colchicina	0,03	0,01	0,01	0,02
7	$9,2 \pm 0,8$	$5,8 \pm 2,0$	$3,6 \pm 0,1$	> 50

Capítulo 4.

Complexos de gálio(III) com *N*(4)-*p*X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas ($X = Cl, F, I, NO_2, CH_3$): atividade antimicrobiana e citotóxica contra células de tumores sólidos

O íon gálio(III) apresenta propriedades semelhantes às do íon ferro(III), como carga, diâmetro do íon e número de coordenação. Como consequência, é possível que o gálio substitua o ferro em alguns sistemas biológicos. De fato, há relatos do uso de gálio como estratégia para interromper o metabolismo de ferro em bactérias *Pseudomonas aeruginosa*¹. Estudos também sugerem que gálio(III) substitui ferro(III) na subunidade R2 da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), a qual está envolvida na síntese do DNA. Essa enzima representa assim um alvo na quimioterapia. O composto nitrato de gálio já tem sido usado na clínica contra certos tipos de tumores².

Tiossemicarbazonas apresentam, dentre outras, propriedades antifúngicas, antibacterianas e antitumorais. A propriedade antitumoral é conferida principalmente a tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas, as quais, assim como o íon gálio(III), têm como alvo a RDR³. Dessa forma, combinar um metal com um ligante que atuam sobre o mesmo alvo biológico constitui uma estratégia interessante no planejamento de inibidores da RDR.

Neste capítulo são apresentados a caracterização e estudos biológicos de cinco complexos de gálio(III) de *N*(4)-*para*-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas ($X = Cl, F, I, NO_2$ e CH_3) (Figura 4.1). A ação antimicrobiana dos compostos foi avaliada contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* e sua atividade citotóxica foi avaliada contra células de glioblastoma multiforme T98G e U87 e de carcinoma de mama MCF-7.

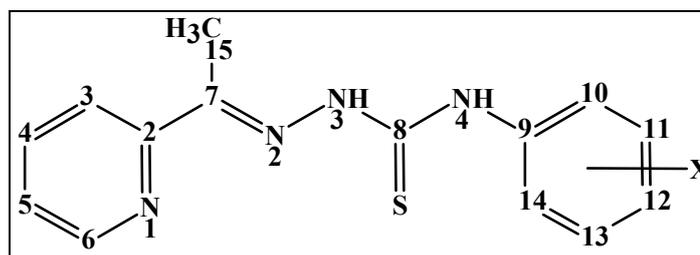


Figura 4.1. Estrutura genérica das *N*(4)-*para*-X-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas ($X = Cl, F, I, NO_2$ e CH_3) utilizadas na síntese de complexos de gálio(III) e numeração adotada para atribuição dos átomos.

¹ Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P.K. Singh, J. Clin. Invest. 117 (2007) 877.

² H.T. Whelan, C. Przybylski, C.R. Chitambar, Pediatr. Neurol. 7 (1991) 23.

³ H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem. 4 (2004) 159.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE GÁLIO(III) COM *N(4)-pX-FENIL 2-ACETILPIRIDINA TIOSSEMICARBAZONAS* ($X = Cl, F, I, NO_2, CH_3$)

Foram sintetizados complexos de gálio(III) com *N(4)-para-fluorfenil-* (H_2Ac_4pFPh), *N(4)-para-clorofenil-* (H_2Ac_4pClPh), *N(4)-para-iodofenil-* (H_2Ac_4pIPh), *N(4)-para-nitrofenil-* ($H_2Ac_4pNO_2Ph$) 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e *N(4)-para-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona* (H_2Ac_4pT): $[Ga(2Ac_4pFPh)_2]NO_3$ (**1**), $[Ga(2Ac_4pClPh)_2]NO_3$ (**2**), $[Ga(2Ac_4pIPh)_2]NO_3$ (**3**), $[Ga(2Ac_4pNO_2Ph)_2]NO_3 \cdot 3H_2O$ (**4**) e $[Ga(2Ac_4pT)_2]NO_3$ (**5**) (Figura 4.1.1). Os complexos foram caracterizados através de ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por seus espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Foram obtidos cristais a partir da solubilização de **1** e **5** em DMSO, os quais foram analisados por difração de raios X (seção 4.2).

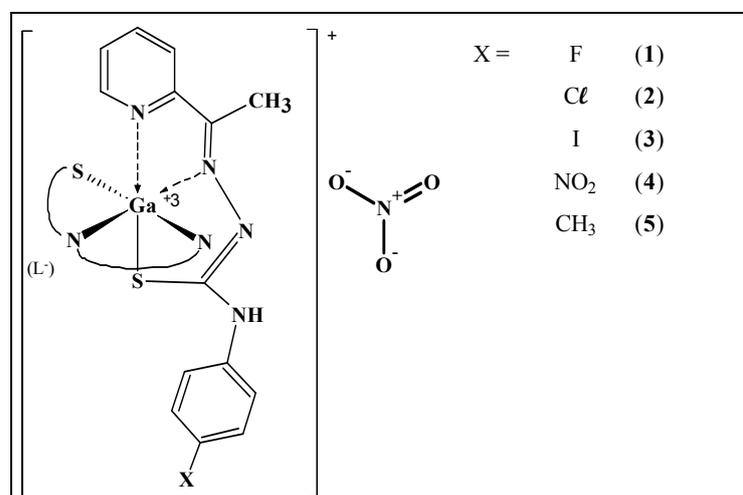


Figura 4.1.1. Estrutura genérica dos complexos de gálio(III) (**1-5**).

Microanálises, massas molares, condutividade molar

Rendimentos das reações, massas molares, microanálises e condutividades molares dos complexos (**1-5**) são apresentados na Tabela 4.1.1. Os resultados das análises sugerem a formação de compostos do tipo $[Ga(L)_2]NO_3$, nos quais duas moléculas de tiossemicarbazona estariam coordenadas ao íon gálio sob a forma aniônica (L^-) (Figura 4.1.1). As análises condutimétricas ($DMF \sim 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) indicam que todos os compostos são eletrólitos 1:1⁴, ou seja, o ânion nitrato atua como contra íon. O complexo (**4**) contém moléculas de água de solvatação, as quais foram confirmadas por espectroscopia de infravermelho.

⁴ W.J. Geary, Coord. Chem. Rev., 7 (1971) 81.

Tabela 4.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão^a, análise elementar^b, massa molar (MM) e condutividade molar (DMF, 1x10⁻³ mol L⁻¹) de [Ga(2Ac4pFPh)₂]₂NO₃ (1), [Ga(2Ac4pClPh)₂]₂NO₃ (2), [Ga(2Ac4pIPh)₂]₂NO₃ (3), [Ga(2Ac4pNO₂Ph)₂]₂NO₃·3H₂O (4) e [Ga(2Ac4pT)₂]₂NO₃ (5)

Composto	R (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	MM (g mol ⁻¹)	A _M (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
(1)	70,3	220,8-221,1 (164,9-165,8)	47,86 (47,61)	3,34 (3,42)	17,69 (17,85)	706,40	62,2
(2)	74,0	192,0-193,5 (177,2-177,7)	45,83 (45,49)	3,33 (3,27)	17,30 (17,05)	739,31	69,3
(3)	57,8	289,1-290,0 (205,0-206,1)	36,75 (36,47)	2,58 (2,62)	13,68 (13,67)	922,21	60,5
(4)	64,0	240 (dec.) ^c (196,3-197,1)	41,54 (41,29)	3,54 (3,71)	18,98 (18,92)	814,46	76,3
(5)	58,1	204,4-205,5 (155,7-156,0)	51,63 (51,59)	4,54 (4,33)	18,07 (18,05)	698,47	65,7

^a Pontos de fusão das tiossemicarbazonas livres se encontram entre parênteses.

^b Valores teóricos entre parênteses.

^c Dec: decomposição.

Espectros de Infravermelho

O estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, em 1597-1581 cm⁻¹ nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas livres desloca-se com a complexação para maiores energias (1609-1605 cm⁻¹), sugerindo que ocorre a coordenação pelo nitrogênio imínico^{5,6}. A banda $\nu(\text{CS})$, na faixa de 825-783 cm⁻¹ nas tiossemicarbazonas livres, encontra-se em menores frequências nos espectros dos complexos (797-772 cm⁻¹), sugerindo a ligação do enxofre ao metal na forma de um tiolato. O modo de deformação do anel da piridina no plano, em 622-621 cm⁻¹ nos espectros das tiossemicarbazonas livres, desloca-se para 638-631 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação pelo nitrogênio piridínico⁷. Novas bandas observadas em 488-428 cm⁻¹, 364-317 cm⁻¹ e 270-210 cm⁻¹ foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Ga}-\text{N})$, $\nu(\text{Ga}-\text{S})$ e $\nu(\text{Ga}-\text{N}_{\text{py}})$, respectivamente⁸. Como exemplo é apresentado o espectro do complexo [Ga(2Ac4pNO₂Ph)₂]₂NO₃·3H₂O (4) em comparação com H₂Ac4pNO₂Ph na faixa de 710-180 cm⁻¹ (Figura 4.1.2).

Os dados obtidos através dos espectros de infravermelho sugerem, portanto, que em todos os complexos, as tiossemicarbazonas ligam-se ao gálio de modo tridentado, através do sistema N_{py}-N-S.

⁵ 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.

⁶ J.J. López-Garriga, G.T. Babcock, J.F. Harrison, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 7241.

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

⁸ V.B. Arion, M.A. Jakupec, M. Galanski, P. Unfried, B.K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 91 (2002) 298.

Novas absorções também foram observadas nas regiões de 1444-1438 cm⁻¹, 858-819 cm⁻¹ e 707-690 cm⁻¹, características dos modos estiramento, deformação fora do plano e deformação no plano de grupo nitrato não coordenado (simetria D_{3h})⁹. Esses dados não somente confirmam a presença de nitrato na estrutura dos complexos, como também sugerem que este grupo atua como contra-íon.

Uma absorção larga em torno de 3430 cm⁻¹ no espectro do complexo (4) foi atribuída à vibração ν(O-H). Na Figura 4.1.3 são apresentados os espectros dos complexos (1) e (4). A banda de ν(O-H) em 4 está ausente em 1.

As atribuições de bandas selecionadas dos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos (1-5) são apresentadas na Tabela 4.1.2

Tabela 4.1.2. Bandas^a selecionadas nos espectros de infravermelho (cm⁻¹) das tiossemicarbazonas e de [Ga(2Ac4pFPh)₂]NO₃ (1), [Ga(2Ac4pClPh)₂]NO₃ (2), [Ga(2Ac4pIPh)₂]NO₃ (3), [Ga(2Ac4pNO₂Ph)₂]NO₃·3H₂O (4) e [Ga(2Ac4pT)₂]NO₃ (5)

Composto	ν(CN)	ν(NO ₃)	π(NO ₃)	δ(NO ₃)	ν(CS)	ρ(py)	ν(MN)	ν(MS)	ν(MN _{uv})
H2Ac4pFPh (1)	1582F 1605F	- 1444F	- 831m	- 707f	825m 797m	622m 634m	- 435f	- 331f	- 243f
H2Ac4pClPh (2)	1582F 1605F	- 1439F	- 833m	- 700f	803m 772m	621m 632m	- 459f	- 327f 319f	- 222f 210f
H2Ac4pIPh (3)	1581F 1606F	- 1438F	- 858m	- 697f	783m 773m	621m 631m	- 446f	- 364m	- 252f 211f
H2Ac4pNO ₂ Ph (4)	1597F 1609F	- 1442F	- 819m	- 690f	796m 782m	621m 632m	- 453f 488f	- 317m	- 287f 258f 210f
H2Ac4pT (5)	1587F 1605F	- 1439F	- 838	- 706f	821m 774m	622m 638m	- 428f	- 331m	- 267f 216f

^a As intensidades das bandas estão assinaladas como: F (forte), m (média) ou f (fraca).

⁹ K. Nakamoto, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 4th ed. New York: Wiley, c1986, p. 124.

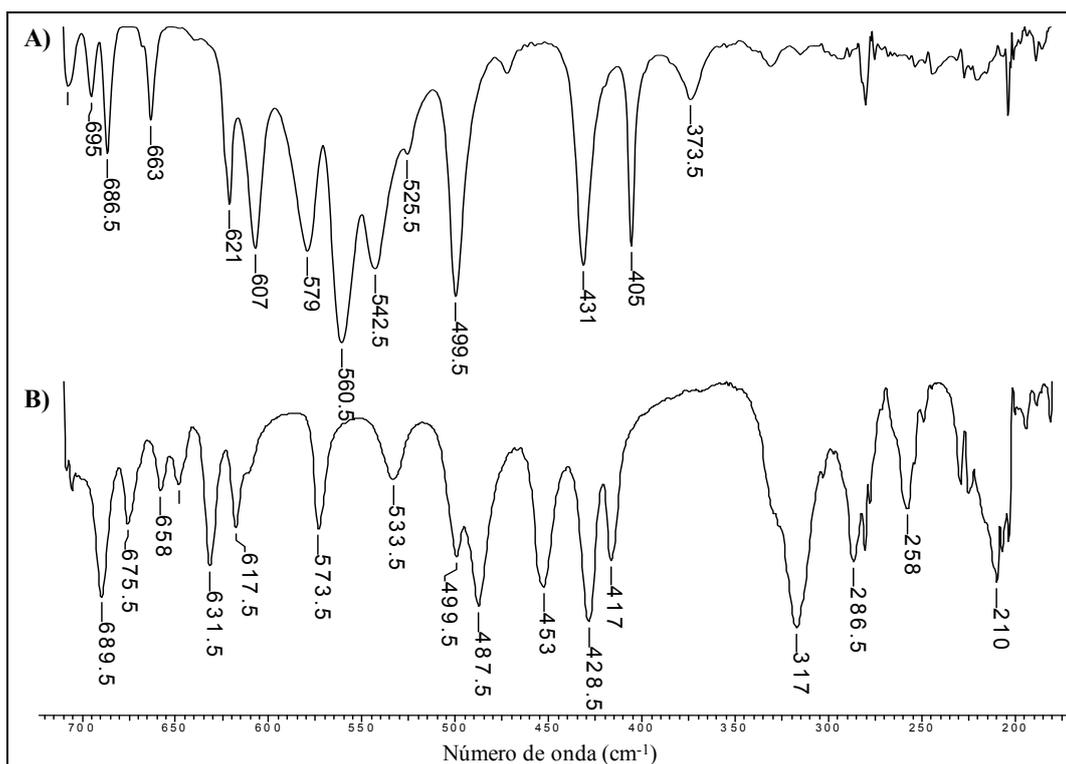


Figura 4.1.2. Espectros de infravermelho A) da tiossemicarbazona $H_2Ac_4pNO_2Ph$ e B) do complexo $[Ga(2Ac_4pNO_2Ph)_2]NO_3 \cdot 3H_2O$ (**4**), obtidos em CsI, na região de 710-180 cm^{-1} .

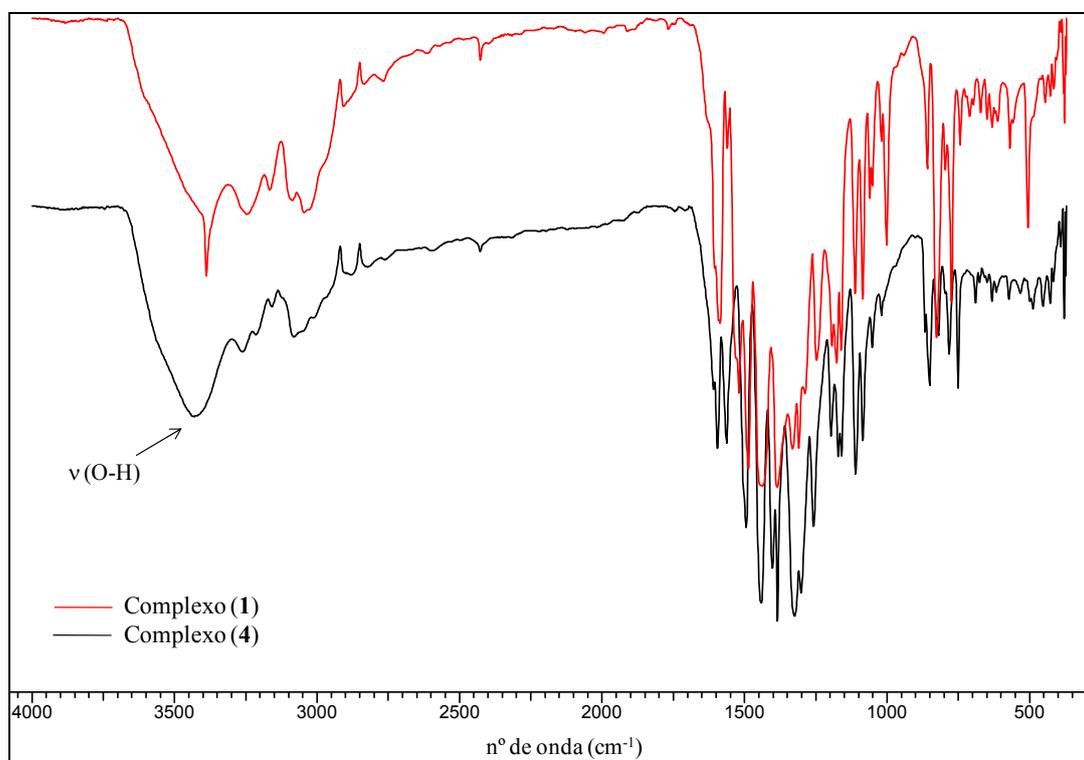


Figura 4.1.3. Espectros dos complexos $[Ga(2Ac_4pFPh)_2]NO_3$ (**1**) e $[Ga(2Ac_4pNO_2Ph)_2]NO_3 \cdot 3H_2O$ (**4**), obtidos em KBr, na região de 4000 - 400 cm^{-1} .

Espectros de ressonância magnética nuclear

Os complexos (**1-5**) foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, COSY e HMQC, utilizando-se DMSO-*d*₆ como solvente.

Nos espectros de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas livres, os sinais estão duplicados, indicando a presença de isômeros configuracionais *Z* e *E*, sendo este último a espécie majoritária (89-96%).

Nos espectros de RMN de ¹H de **1-5** observa-se o desaparecimento do sinal de N(3)-H, indicando que a tiossemicarbazona encontra-se desprotonada quando coordenada ao centro metálico, conforme pode ser exemplificado pelo espectro de RMN de ¹H do complexo (**3**) (Figura 4.1.4). Observa-se que os sinais dos hidrogênios da piridina sofrem significativo deslocamento com a complexação. Os sinais não estão duplicados, indicando que as duas moléculas do ligante coordenadas ao mesmo centro metálico são equivalentes. Os sinais de RMN de ¹H dos complexos (**1-5**) em comparação com as tiossemicarbazonas livres são apresentados na Tabela 4.1.3.

Os espectros de RMN de ¹³C dos complexos (**1-5**) indicam que pela coordenação a maioria dos sinais de carbonos da piridina, assim como C(7) e C(8) sofrem deslocamentos significativos com relação às suas posições nas tiossemicarbazonas livres. Isto sugere o envolvimento dos nitrogênios piridínico e imínico e do enxofre na coordenação ao centro metálico, pelo sistema N_{py}-N-S, indicando que as tiossemicarbazonas adotam a configuração *E* quando coordenadas. Esta característica foi observada para todos os complexos. A Figura 4.1.5 apresenta o espectro de RMN de ¹³C do complexo (**3**). Os sinais de RMN de ¹³C das tiossemicarbazonas e dos complexos (**1-5**) são apresentados na Tabela 4.1.4.

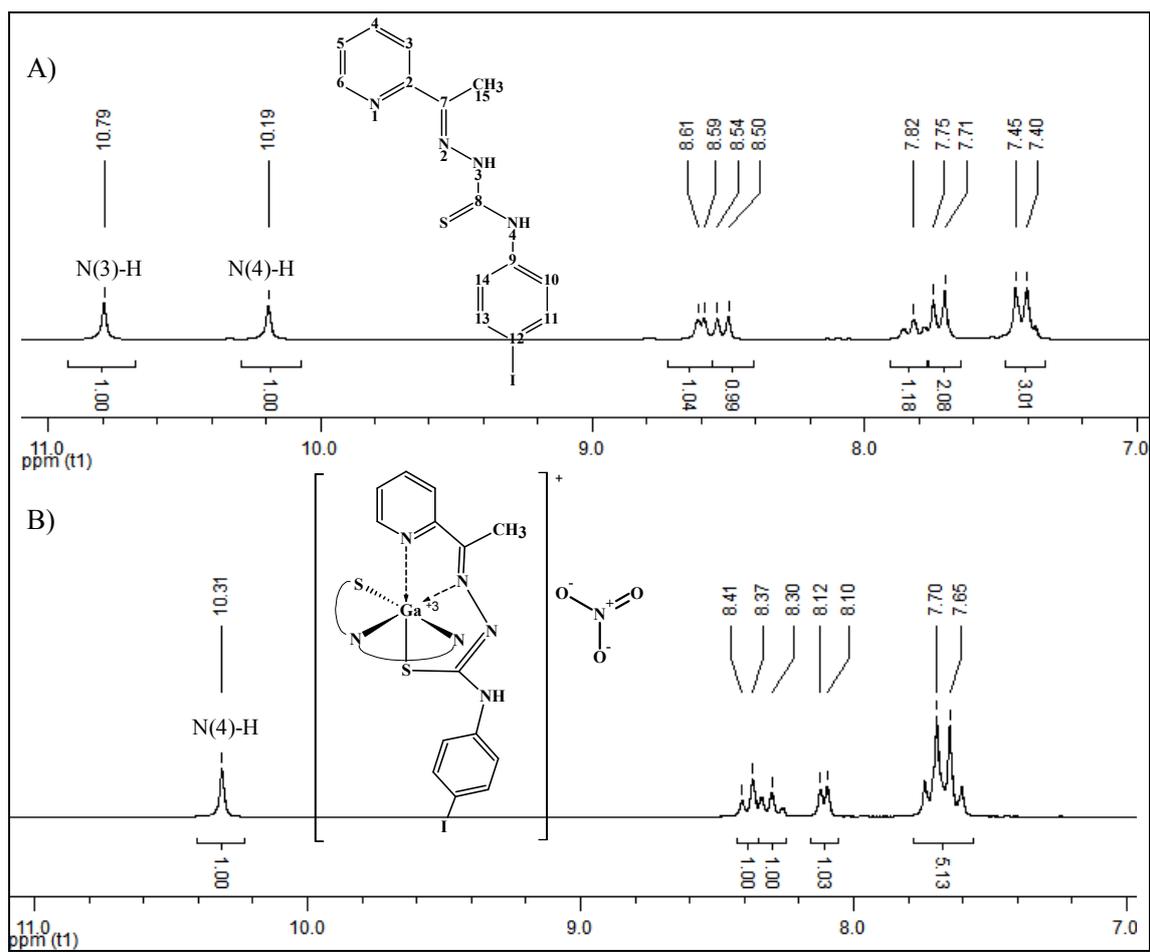


Figura 4.1.4. Espectros de RMN de ¹H de A) H₂Ac₄pIPh e B) [Ga(2Ac₄pIPh)₂]⁺NO₃⁻ (**3**) (DMSO-*d*₆).

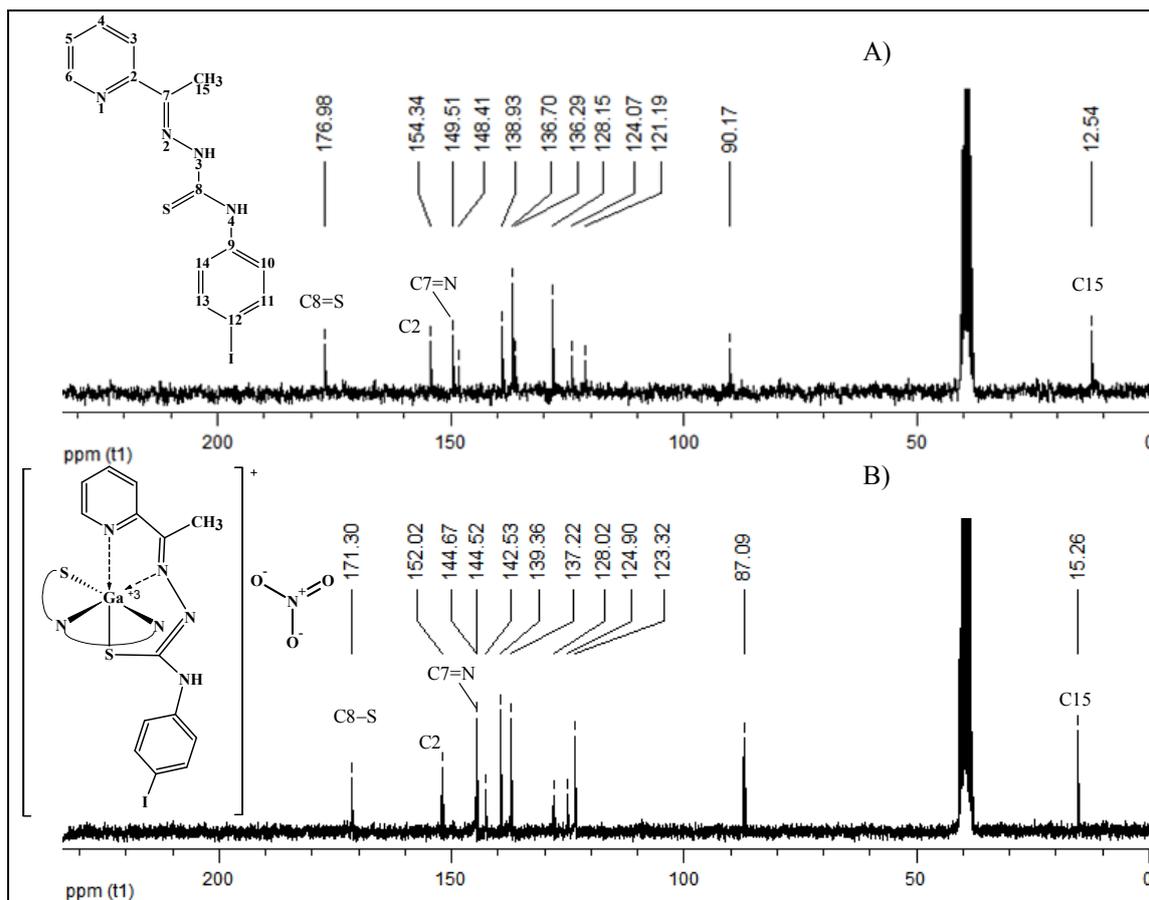


Figura 4.1.5. Espectros de RMN de ¹³C de A) H₂Ac₄pIph e B) (3) (DMSO-d₆).

Tabela 4.1.3. Atribuições (A), multiplicidade (M)^a, número de hidrogênios (n^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ¹H dos complexos (1-5) em comparação com as tiossemicarbazonas HL₁ – HL₅^b (DMSO-*d*₆)

A	n ^o	M	HL ₁	(1)	M	HL ₂	(2)	M	HL ₃	(3)	M	HL ₄	(4)	M	HL ₅	(5)
N(3)H	1	s	10,74	-	s	10,79	-	s	10,79	-	s	11,11	-	s	10,60	-
N(4)H	1	s	10,19	10,29	s	10,22	10,35	s	10,19	10,31	s	10,50	10,77	s	10,14	10,20
H(6)	1	d	8,60	8,11	d	8,61	8,12	d	8,60	8,11	d	8,63	8,19	d	8,60	8,09
H(3)	1	d	8,56	8,37	d	8,53	8,39	d	8,52	8,39	d	8,49	8,48	d	8,52	8,34
H(4)	1	t	7,81	8,29	t	7,82	8,30	t	7,82	8,30	t	7,86	8,34	t	7,82	8,26
H(5)	1	t	7,40	7,67	sp	7,50-7,35	7,68	t	7,50-7,35	7,78-7,56	t	7,44	7,73	sp	7,45-7,35	7,75-7,55
H(15)	3	2	2,47	2,93	s	2,47	2,95	s	2,47	2,94	s	2,51	3,03	s	2,45	2,92

^a s=simpleto; d=dupleto, t=tripleto, sp=superposto;

^b HL₁ = H2Ac4pFPh, HL₂ = H2Ac4pClPh, HL₃ = H2Ac4pIPh, HL₄ = H2Ac4pNO₂Ph e HL₅ = H2Ac4pT.

Tabela 4.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³C e DEPT 135 (D) de complexos (1-5) em comparação com as tiossemicarbazonas HL₁ – HL₅^a (DMSO-*d*₆)

A	D	HL ₁	(1)	HL ₂	(2)	HL ₃	(3)	HL ₄	(4)	HL ₅	(5)
C(8)=S	-	177,57	171,54	177,20	171,36	176,98	171,29	176,61	171,46	177,29	171,46
C(2)	-	154,41	151,27	154,36	152,01	154,34	152,02	154,21	154,77	154,41	150,52
C(7)=N	-	149,24	144,65	149,50	144,54	149,51	144,52	150,54	144,33	148,92	144,71
C(12)-X		162,14 / 157,33	160,49 / 155,70	129,47	126,99	90,17	87,09	143,52	141,7	134,83	132,57
C(6)	↑	148,39	144,63	148,41	144,71	148,41	144,67	148,48	144,92	148,42	144,58
C(9)	-	135,46 / 135,41	135,98 / 135,93	138,04	138,51	138,93	139,36	145,28	145,58	136,53	137,07
C(4)	-	136,26	142,51	136,29	142,56	136,70	142,52	136,37	142,76	136,56	142,44
C(5)	↑	124,04	127,90	124,08	128,04	124,07	128,02	124,25	128,56	124,17	128,99
C(3)	↑	121,18	124,75	121,19	124,92	121,19	124,90	121,25	125,49	121,31	124,59
C(15)	↑	12,44	15,13	12,51	15,28	12,54	15,26	12,78	15,72	12,50	15,03

^a HL₁ = H2Ac4pFPh, HL₂ = H2Ac4pClPh, HL₃ = H2Ac4pIPh, HL₄ = H2Ac4pNO₂Ph e HL₅ = H2Ac4pT

4.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS

Cristais de [Ga(2Ac4*p*FPh)₂]₂NO₃·DMSO (**1a**) e [Ga(2Ac4*p*T)₂]₂NO₃·DMSO (**5a**) obtidos da partir da dissolução dos complexos (**1**) e (**5**), respectivamente, em DMSO foram submetidos a análise por difração de raios X de monocristal. Os dados dos compostos foram coletados à temperatura ambiente (293 K) em difratômetro Oxford GEMINI, no modo θ–2θ. A resolução e o refinamento das estruturas foram realizados utilizando-se os programas SHELXS-97¹⁰, SHELXL-97¹¹ e WinGX¹². Os resumos da coleção de dados e dos refinamentos estão dispostos na Tabela 4.2.1.

As estruturas determinadas para os compostos e a numeração proposta são mostradas na Figura 4.2.1. Distâncias e ângulos de ligação para **1a** e **5a** são apresentados nas Tabelas 4.2.2 e 4.2.3 juntamente com H2Ac4*p*FPh (ver seção 3.2), H2Ac4Ph¹³ e seu complexo de gálio(III) [Ga(2Ac4Ph)₂]₂NO₃·DMSO¹⁴ para comparação. Na Tabela 4.2.4 são mostradas as ligações de hidrogênio calculadas para **1a** e **5a**.

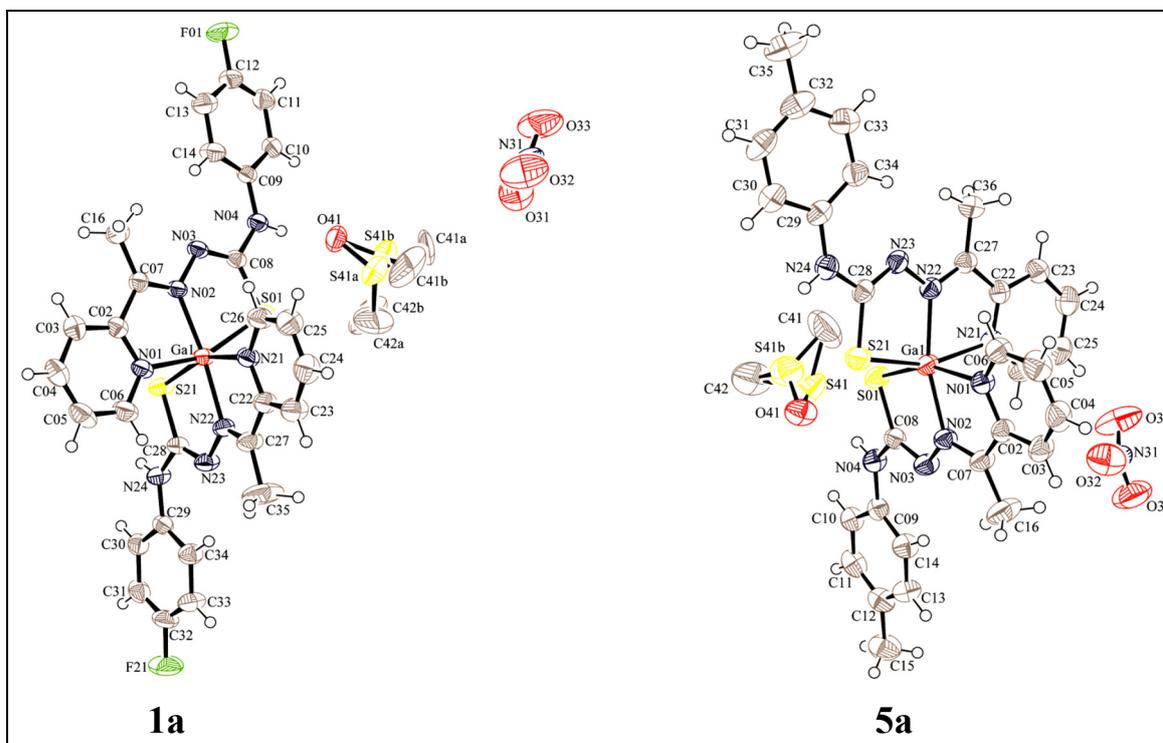


Figura 4.2.1. Diagramas ORTEP de [Ga(2Ac4*p*FPh)₂]₂NO₃·DMSO (**1a**) e [Ga(2Ac4*p*T)₂]₂NO₃·DMSO (**5a**).

Em **1a** e **5a** o cátion gálio(III) apresenta um ambiente octaédrico distorcido. Duas moléculas de tiossemicarbazonas na sua forma aniônica se encontram coordenadas de modo

¹⁰ G.M. Sheldrick, SHELXS-97: Program for the Solution of Crystal Structures; University of Göttingen, Germany (1997).

¹¹ G.M. Sheldrick, SHELXL-97: Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany (1997).

¹² L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst., 32 (1999) 837.

¹³ E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D.X. West, Z. Anorg. Allg. Chem. 625 (1999) 961.

¹⁴ J.G. da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301.

tridentado ao íon metálico pelos átomos N(1), N(2) e S(1), formando dois anéis quelatos de cinco membros. A formação dos anéis de cinco membros é presumidamente a razão da geometria octaédrica distorcida, pelo fato de os ângulos intraligantes N_{py}-Ga-N e N-Ga-S serem próximos a 80°. Assim como observado para [Ga(2Ac4Ph)₂]NO₃·DMSO¹⁴, os átomos de enxofre de **1a** e **5a** estão em posições *cis*, formando ângulo S(1)-Ga(1)-S(21) em torno de 97°.

Com a desprotonação em N(3) (molécula 1) e N(23) (molécula 2) de **1a**, observa-se aumento no comprimento das ligações C(1)-S(8) e C(21)-S(28), as quais passam de ligação dupla na tiossemicarbazona H2Ac4pFPh livre para ligação simples nas tiossemicarbazonas complexadas. Por outro lado, se observa diminuição das ligações C(8)-N(3) e C(28)-N(23), as quais passam de ligação simples para ligação dupla nas tiossemicarbazonas coordenadas (ver Tabela 4.2.2).

Em **1a**, as duas moléculas de tiossemicarbazonas se encontram coordenadas na conformação *EZ* em relação às ligações C(7)=N(2) e C(8)=N(3) (molécula 1) e C(27)=N(22) e C(28)=N(23) (molécula 2), enquanto que a tiossemicarbazona livre H2Ac4pFPh cristaliza-se na conformação *EE*. A mudança de conformação também foi observada para H2Ac4Ph¹³ quando complexado em [Ga(2Ac4Ph)₂]NO₃·DMSO¹⁴.

Tabela 4.2.1. Resumo da coleção de dados e refinamento para [Ga(2Ac4pFPh)₂]NO₃·DMSO (**1a**) e [Ga(2Ac4pT)₂]NO₃·DMSO (**5a**)

Composto	1a	5a	
Fórmula molecular	C ₃₀ H ₂₄ F ₂ GaN ₉ O ₄ S ₃	C ₃₂ H ₃₀ GaN ₉ O ₄ S ₃	
Massa molecular, g mol ⁻¹	778,48	770,55	
Sistema cristalino	Ortorrômico	Ortorrômico	
Grupo de espaço	<i>Pbca</i>	<i>Pbca</i>	
Difratômetro	Oxford	Oxford	
Temperatura, K	293(2)	298(2)	
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073	
Dimensões da Célula unitária	a, Å	16,7849(3)	16,5819(3)
	b, Å	20,1938(3)	20,0534(5)
	c, Å	20,8105(3)	20,5355(4)
	α, °	90	90
	β, °	90	90
	γ, °	90	90
Volume, Å ³	6828,5(2)	7053,74(19)	
Z / Dens. calc., Mg m ⁻³	8 / 1,514	8 / 1,451	
Coef. de absorção, mm ⁻¹	1,050	1,008	
F(000)	3168	3168	
Correção de absorção	Multi-scan	Multi-scan	
Dimensões do cristal, mm	0,24 x 0,22 x 0,14	0,24 x 0,20 x 0,13	
Intervalo de θ, °	2,84 - 26,37	2,80 - 26,37	
	-20 ≤ h ≤ 16	-20 ≤ h ≤ 16	
Intervalo de hkl	-25 ≤ k ≤ 24	-24 ≤ k ≤ 25	
	-21 ≤ l ≤ 25	-21 ≤ l ≤ 26	
Completeza, %	99,9 (26,37°)	99,9 (26,37°)	
S	0,871	0,958	
Reflexões medidas/únicas (R _{int})	29429 / 6973 (0,0472)	33198 / 7201 (0,0333)	
Dados/Restrições/parâmetros	6973 / 3 / 470	7201 / 0 / 460	
R (obs/total)	0,0371 / 0,0746	0,0378 / 0,0636	
wR (obs/total)	0,0926 / 0,0989	0,1029 / 0,1084	
Δρ min/Max, e Å ⁻³	0,843 / -0,296	0,551 / -0,608	

Tabela 4.2.2. Comprimentos de ligação (Å) selecionados de [Ga(2Ac4pFPh)₂]NO₃·DMSO (**1a**) e [Ga(2Ac4pT)₂]NO₃·DMSO (**5a**) em comparação com H2Ac4Ph¹³, [Ga(2Ac4Ph)₂]NO₃·DMSO¹⁴ e H2Ac4pFPh

Átomos	H2Ac4Ph	[Ga(2Ac4Ph) ₂]NO ₃ ·DMSO	H2Ac4pFPh	1a	5a
Ga(1)–N(1)	-	2,122(3)	-	2,142(2)	2,121(2)
Ga(1)–N(21)	-	2,127(3)	-	2,126(2)	2,148(2)
Ga(1)–N(2)	-	2,058(3)	-	2,043(2)	2,054(2)
Ga(1)–N(22)	-	2,048(3)	-	2,048(2)	2,034(2)
Ga(1)–S(1)	-	2,377(1)	-	2,3819(9)	2,3743(7)
Ga(1)–S(21)	-	2,377(1)	-	2,3743(8)	2,3868(8)
S(1)–C(8)	1,677(2)	1,742(4)	1,6722(16)	1,750(3)	1,742(3)
S(21)–C(28)	-	1,748(4)	-	1,745(3)	1,744(3)
N(2)–C(7)	1,284(3)	1,301(5)	1,2799(18)	1,293(4)	1,294(3)
N(22)–C(27)	-	1,291(5)	-	1,299(3)	1,300(3)
N(2)–N(3)	1,376(2)	1,372(4)	1,3759(16)	1,372(3)	1,367(3)
N(22)–N(23)	-	1,373(4)	-	1,369(3)	1,371(3)
N(3)–C(8)	1,358(3)	1,327(5)	1,3498(19)	1,309(4)	1,317(3)
N(23)–C(28)	-	1,321(5)	-	1,316(3)	1,308(3)

Tabela 4.2.3. Ângulos de ligação (°) selecionados de [Ga(2Ac4pFPh)₂]NO₃·DMSO (**1a**) e [Ga(2Ac4pT)₂]NO₃·DMSO (**5a**) em comparação com H2Ac4Ph¹³, [Ga(2Ac4Ph)₂]NO₃·DMSO¹⁴ e H2Ac4pFPh

Átomos	H2Ac4Ph	[Ga(2Ac4Ph) ₂]NO ₃ ·DMSO	H2Ac4pFPh	1a	5a
N(2)–N(3)–C(8)	118,9(2)	113,4(3)	119,11(12)	114,2(2)	113,9(2)
N(22)–N(23)–C(28)	-	113,6(3)	-	113,3(2)	113,9(2)
N(3)–C(8)–S(1)	119,7(1)	126,6(3)	120,20(11)	126,8(2)	126,5(2)
N(23)–C(28)–S(21)	-	126,7(3)	-	126,8(2)	126,8(2)
N(4)–C(8)–N(3)	114,8(2)	119,0(4)	114,63(13)	117,9(2)	117,4(2)
N(24)–C(28)–N(23)	-	118,4(4)	-	118,2(2)	117,2(2)
N(4)–C(8)–S(1)	125,5(2)	114,4(3)	125,16(12)	115,3(2)	116,11(18)
N(24)–C(28)–S(21)	-	114,9(3)	-	114,96(19)	115,9(2)
C(7)–N(2)–N(3)	118,8(2)	118,3(3)	118,86(12)	117,3(2)	117,6(2)
C(27)–N(22)–N(23)	-	118,3(3)	-	117,5(2)	117,0(2)
C(8)–N(4)–C(9)	127,6(2)	131,0(3)	127,11(13)	130,2(3)	131,2(2)
C(28)–N(24)–C(29)	-	130,4(3)	-	130,8(2)	130,3(3)
N(2)–Ga(1)–N(1)	-	77,1(1)	-	76,37(9)	76,35(8)
N(22)–Ga(1)–N(21)	-	76,9(1)	-	76,74(9)	76,42(8)
N(1)–Ga(1)–S(1)	-	158,61(9)	-	158,33(7)	158,10(6)
N(21)–Ga(1)–S(21)	-	158,80(9)	-	158,47(7)	158,08(6)
N(2)–Ga(1)–S(1)	-	81,82(9)	-	82,30(7)	81,81(6)
N(22)–Ga(1)–S(21)	-	82,23(9)	-	81,86(6)	82,01(6)
N(1)–Ga(1)–S(21)	-	93,42(9)	-	91,87(6)	91,75(6)
N(2)–Ga(1)–S(21)	-	107,97(9)	-	105,80(6)	110,09(7)
S(1)–Ga(1)–S(21)	-	96,75(4)	-	97,62(3)	97,27(3)
S(1)–Ga(1)–N(22)	-	103,68(9)	-	110,15(7)	106,33(6)

Tabela 4.2.4. Ligações de hidrogênio calculadas para $\text{Ga}(\text{2Ac4pFPh})_2\text{NO}_3 \cdot \text{DMSO}$ (**1a**) e $[\text{Ga}(\text{2Ac4pT})_2]\text{NO}_3 \cdot \text{DMSO}$ (**5a**)

Composto	D–H···A ^a	d(D–H) (Å)	d(H···A) (Å)	d(D···A) (Å)	(D–H···A) (°)
1a	N(04)–H(04A)···O(41)	0,86	2,04	2,892(3)	171,0
	N(04)–H(04A)···S(41A)	0,86	3,01	3,820(3)	158,1
	N(24)–H(24A)···O(41) [1 x+1/2,-y+3/2,-z+1]	0,86	2,08	2,921(3)	167,2
	N(24)–H(24A)···S(41B) [1 x+1/2,-y+3/2,-z+1]	0,86	2,97	3,805(4)	163,9
5a	N(04)–H(04A)···O(41)	0,73(2)	2,28(3)	2,999(3)	168(3)
	N(24)–H(24A)···O(41) [x-1/2,-y+1/2,-z+1]	0,82(3)	2,21(3)	3,022(4)	168(2)

^a As operações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes se encontram entre colchetes.

4.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Foi investigada a ação antimicrobiana dos compostos pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra bactérias *gram-positivas Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), bactérias *gram-negativas Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e fungos *Candida albicans* (ATCC 10231). Também foi avaliada a atividade citotóxica dos compostos contra células de glioblastoma multiforme T98G e U87 e de carcinoma de mama MCF-7.

Atividade antimicrobiana

Foram testadas as atividades antimicrobianas das tiossemicarbazonas e seus complexos de gálio(III) com o objetivo de avaliar o efeito da coordenação sobre a atividade antimicrobiana de tiossemicarbazonas (ver seção 3.3). Os valores de CIM determinados para os compostos estão listados na Tabela 4.3.1, juntamente com os valores determinados para nitrato de gálio e para os fármacos controle cloridrato de tetraciclina e fluconazol.

 Tabela 4.3.1. Atividade contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* das tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), nitrato de gálio, cloridrato de tetraciclina e fluconazol

Composto	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
H2Ac4pFPh	91,9	>343,3	20,6
$[\text{Ga}(\text{2Ac4pFPh})_2]\text{NO}_3$ (1)	73,6	24,1	7,9
H2Ac4pClPh	42,7	111,5	17,0
$[\text{Ga}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{NO}_3$ (2)	69,0	70,3	5,9
H2Ac4pIPh	66,0	>85,8	10,7
$[\text{Ga}(\text{2Ac4pIPh})_2]\text{NO}_3$ (3)	59,1	55,3	6,2
H2Ac4pNO ₂ Ph	82,4	>164,9	10,7
$[\text{Ga}(\text{2Ac4pNO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4)	34,6	33,1	11,2
H2Ac4pT	61,5	126,6	23,9
$[\text{Ga}(\text{2Ac4pT})_2]\text{NO}_3$ (5)	38,7	35,8	7,6
nitrato de gálio	> 1994,2	496,6	> 232,2
cloridrato de tetraciclina	0,3	30,4	-
fluconazol	-	-	6,2

Os valores de CIM revelam que as bactérias *gram*-positivas *S. aureus* foram mais sensíveis às tiossemicarbazonas do que as bactérias *gram*-negativas, *P. aeruginosa*. Os fungos *C. albicans* foram a cepa mais sensível à ação das tiossemicarbazonas. A coordenação a gálio(III) não faz aumentar a ação das tiossemicarbazonas frente a *S. aureus*. Por outro lado, os complexos foram mais ativos contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* do que as tiossemicarbazonas livres. O efeito da complexação sobre a atividade dos compostos foi mais pronunciado no caso da atividade contra *P. aeruginosa*. O complexo (1), por exemplo, foi pelo menos quatorze vezes mais ativo contra essa bactéria do que H2Ac4pFPh. Comportamento similar apresentado por outros complexos de gálio com tiossemicarbazonas frente a *P. aeruginosa* foi recentemente relatado por nosso grupo de pesquisa¹⁴.

Os efeitos adversos resultantes da administração de cloridrato de tetraciclina e fluconazol, bem como o surgimento de resistência microbiana aos fármacos impulsionam a investigação de novos compostos antimicrobianos. Nesse sentido, os complexos de gálio(III) seriam interessantes candidatos a fármacos, uma vez que estes apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* similar aos fármacos utilizados como controle.

O composto nitrato de gálio, por sua vez, não é ativo contra as cepas. Possivelmente seu caráter hidrofílico dificulta a passagem gálio(III) através da membrana celular. Portanto, a complexação provavelmente possibilitou a captação de gálio(III) pelas bactérias e fungos, resultando em aumento da atividade antimicrobiana. A atividade possivelmente é conferida ao efeito sinérgico de ambos o metal e a tiossemicarbazona. A coordenação constituiu, portanto, uma estratégia interessante de redução de doses contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Atividade citotóxica

No capítulo anterior, foi apresentada a atividade citotóxica contra células T98G, U87 e MCF-7 de H2Ac4Ph e seus derivados com substituintes flúor, cloro, iodo e nitro nas posições *N*(4)-*o*-, *N*(4)-*m*- e *N*(4)-*p*-fenil. Os isômeros *para* foram utilizados na obtenção de complexos de gálio(III), com o intuito de investigar o efeito da complexação sobre a atividade citotóxica desses compostos contra as mesmas linhagens. As concentrações dos compostos que inibem o crescimento de 50% (CI₅₀) das células de glioblastoma T98G, e U87, e de tumor mamário MCF-7 em comparação com etoposídeo são apresentadas na Tabela 4.3.2. Não foi determinada a CI₅₀ do sal nitrato de gálio em função de sua baixa atividade citotóxica contra as linhagens.

Foi realizado um ensaio de atividade hemolítica com o intuito de avaliar a toxicidade dos compostos contra células saudáveis. Este ensaio também permite avaliar o potencial das substâncias em romper a membrana celular das células vermelhas do sangue, sendo um modo de averiguação se rompimento da membrana celular é o mecanismo pelo qual estes compostos induzem morte das células.

Tabela 4.3.2. Efeito citotóxico (CI₅₀) contra células T98G, U87 e MCF-7 e atividade hemolítica de tiossemicarbazonas e seus complexos de gálio(III) em comparação com etoposídeo

Composto	CI ₅₀ (mol L ⁻¹)			Atividade hemolítica
	T98G (p53 mutante)	U87 (p53)	MCF-7	
H2Ac4pFPh (1)	1,7 x 10 ⁻⁸ ± 1,9 x 10 ⁻⁹ 7,9 x 10 ⁻⁹ ± 4,0 x 10 ⁻⁹	1,0 x 10 ⁻⁸ ± 1,0 x 10 ⁻⁸ 5,2 x 10 ⁻⁹ ± 2,9 x 10 ⁻⁹	1,2 x 10 ⁻⁹ ± 7,3 x 10 ⁻¹⁰ 4,5 x 10 ⁻⁹ ± 2,8 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵ > 10 ⁻⁵
H2Ac4pClPh (2)	5,9 x 10 ⁻⁹ ± 7,6 x 10 ⁻¹⁰ 5,0 x 10 ⁻⁹ ± 2,9 x 10 ⁻⁹	1,7 x 10 ⁻⁹ ± 8,2 x 10 ⁻¹⁰ 6,9 x 10 ⁻⁹ ± 2,2 x 10 ⁻⁹	8,5 x 10 ⁻⁹ ± 4,1 x 10 ⁻¹⁰ 4,1 x 10 ⁻⁹ ± 9,1 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵ > 10 ⁻⁵
H2Ac4pIPh (3)	6,4 x 10 ⁻⁸ ± 3,6 x 10 ⁻⁸ 8,3 x 10 ⁻⁹ ± 6,5 x 10 ⁻¹⁰	5,9 x 10 ⁻⁸ ± 3,7 x 10 ⁻⁸ 1,3 x 10 ⁻⁸ ± 5,0 x 10 ⁻⁹	6,6 x 10 ⁻⁹ ± 3,2 x 10 ⁻⁹ 9,5 x 10 ⁻⁹ ± 1,2 x 10 ⁻¹⁰	> 10 ⁻⁵ > 10 ⁻⁵
H2Ac4pNO ₂ Ph (4)	1,4 x 10 ⁻⁷ ± 1,1 x 10 ⁻⁸ 4,6 x 10 ⁻⁸ ± 1,8 x 10 ⁻⁸	1,6 x 10 ⁻⁷ ± 5,6 x 10 ⁻⁸ 1,7 x 10 ⁻⁷ ± 6,7 x 10 ⁻⁸	5,2 x 10 ⁻⁸ ± 2,1 x 10 ⁻⁸ 4,0 x 10 ⁻⁸ ± 1,5 x 10 ⁻⁸	> 10 ⁻⁵ > 10 ⁻⁵
Etoposídeo	4,6 x 10 ⁻⁷ ± 2,5 x 10 ⁻⁸	6,2 x 10 ⁻⁷ ± 1,5 x 10 ⁻⁷	4,8 x 10 ⁻⁷ ± 7,0 x 10 ⁻⁸	-

Diferente do efeito observado para a atividade contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*, em geral, a coordenação a gálio(III) não resultou em aumento da ação citotóxica em relação às tiossemicarbazonas livres. Verifica-se um aumento, embora pouco expressivo, na atividade de **1**, **3** e **4** contra células T98G e na atividade de **2** contra MCF-7 em relação às tiossemicarbazonas. Todos os compostos foram mais citotóxicos contra as três linhagens do que o controle etoposídeo e apresentaram baixa atividade hemolítica, sugerindo que os compostos são mais tóxicos para as células tumorais do que contra células saudáveis.

Nosso grupo de pesquisa apresentou em 2009 o primeiro relato de citotoxicidade de complexos de gálio contra as linhagens de tumor cerebral RT2 e T98G. Tais complexos demonstraram maior atividade do que as tiossemicarbazonas livres¹⁵. Entretanto, os complexos (**1-4**) não se revelaram mais potentes do que suas tiossemicarbazonas contra células tumorais T98G, U87 e MCF-7.

Os compostos apresentaram baixa atividade hemolítica (CI₅₀ > 10⁻⁵ mol L⁻¹), sugerindo que o rompimento da membrana celular não é o mecanismo pelo qual induzem morte das células.

¹⁵ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

Capítulo 5.

Investigação do perfil farmacológico de complexos de antimônio(III), bismuto(III) e ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil-, 2-acetil- e 2-benzoilpiridina

Bismuto, antimônio e ouro são exemplos de metais que já se encontram em uso clínico para o tratamento de diferentes enfermidades.

Compostos de antimônio são utilizados na clínica para o tratamento de leishmanioses, porém seu uso está associado a problemas, como efeitos colaterais e surgimento de resistência¹. Desse modo torna-se importante a procura por novos candidatos a protótipos de fármacos anti-leishmania. Uma vez que *Trypanosoma cruzi*, apresenta similaridades bioquímicas com *Leishmania*, fármacos planejados para o combate de uma doença podem ser úteis no combate da outra.

O bismuto é utilizado no tratamento de doenças do trato gastrointestinal e de infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*², mas compostos desse metal mostram também atividade contra outros microorganismos³ e recentemente apareceram relatos sobre a ação citotóxica de compostos de bismuto contra células tumorais⁴. Compostos de bismuto e antimônio têm sido investigados como agentes antibacterianos⁵.

Compostos de ouro(I) são utilizados no tratamento de artrite reumatóide. Compostos de ouro(I) e ouro(III) também vêm ganhando cada vez mais atenção em função de seus efeitos citotóxicos contra células tumorais, através da inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), envolvida na biossíntese do ADN⁶.

Considerando-se o amplo perfil farmacológico das tiossemicarbazonas e sua capacidade quelante⁷, a busca por novos metalofármacos à base de antimônio, bismuto e ouro com esses ligantes revela-se interessante, e poderia resultar em novos compostos com propriedades terapêuticas distintas daquelas das tiossemicarbazonas de partida.

Neste trabalho são apresentadas as caracterizações e atividades biológicas de complexos de antimônio(III) e bismuto(III) obtidos a partir de *N*(4)-fenil 2-formilpiridina tiossemicarbazona (H₂Fo4Ph) e *N*(4)-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H₂Ac4Ph). Foi investigada a atividade desses complexos contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* e contra a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Também foi investigada a atividade dos complexos de antimônio(III) contra *Trypanosoma cruzi*.

¹ R. Balanã-Fouce, R.M. Reguera, J.C. Cubría, D. Ordóñez, Gen. Pharmacol. 30 (1998) 435.

² G.G. Briand, N. Burford, Chem. Rev. 99 (1999) 2601.

³ J.P. Folsom, B. Baker, P.S. Stewart, J. Applied Microbiol. 111 (2011) 989.

⁴ H. Li, C. Sing Lai, J. Wu, P.C. Ho, D. de Vos, E.R.T. Tiekink, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 809.

⁵ N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomyia, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176.

⁶ I. Ott, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1670.

⁷ H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem. 4 (2004) 159.

Além disso, são apresentadas as caracterizações dos complexos de ouro(I) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4DH), seus derivados *N*(4)-metil- (H2Ac4Me) e *N*(4)-fenil- (H2Ac4Ph) substituídos e com *N*(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph). Foram investigados a citotoxicidade e o potencial pró-apoptótico dos complexos de ouro(I) contra células leucêmicas, de carcinoma de mama e de carcinoma colorretal. O mecanismo de ação dos compostos foi investigado através de estudos de interação com ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmidial e de inibição da atividade enzimática de TrxR.

5.1 Complexos de antimônio(III) e bismuto(III) com *N*(4)-fenil-2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4Ph) e *N*(4)-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph)

5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE ANTIMÔNIO(III) E BISMUTO(III)

Foram sintetizados os complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (2) [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (4) com *N*(4)-fenil-2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4Ph) e *N*(4)-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph) (Figuras 5.1.1.1 e 5.1.1.2). Os produtos foram caracterizados por seus pontos de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por seus espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Foram obtidos cristais a partir da solubilização de 1, 3 e 4 em DMSO, os quais foram submetidos a análise por difração de raios X de monocristal (ver seção 5.1.2).

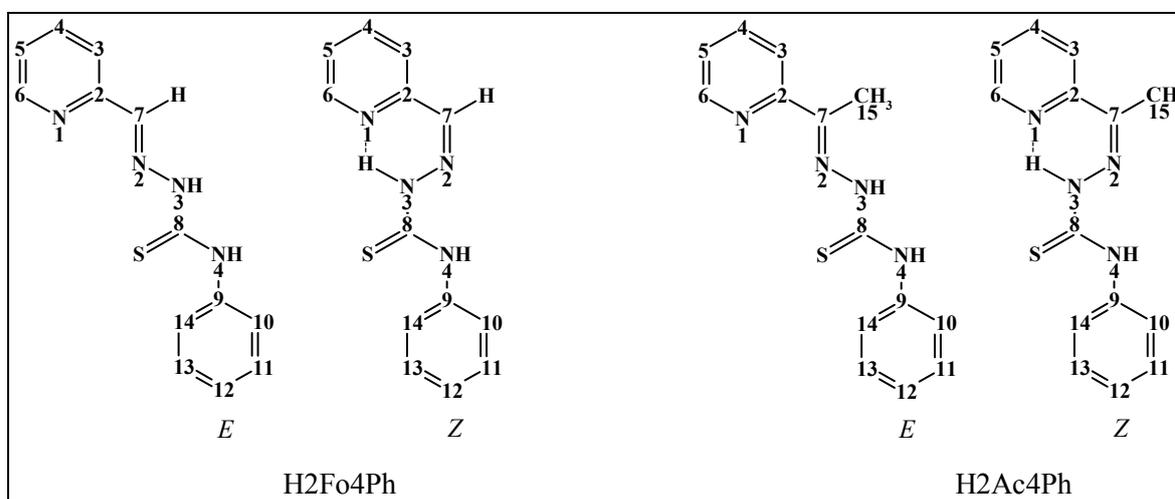


Figura 5.1.1.1. Estruturas das tiossemicarbazonas H2Fo4Ph e H2Ac4Ph (isômeros *E* e *Z*), as quais foram utilizadas para as sínteses dos complexos (1-4), e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

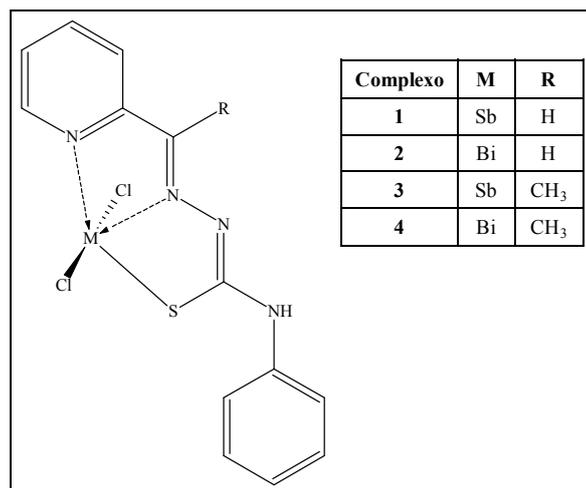


Figura 5.1.1.2. Estruturas dos complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (2), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (4).

Microanálises, massas molares e condutividade molar

Os resultados das análises sugerem a formação de complexos do tipo [M(L)Cl₂] (M = antimônio ou bismuto), nos quais uma molécula de tiossemicarbazona estaria coordenada ao íon metálico sob a forma aniônica (L⁻). As análises condutimétricas (DMF ~ 1,0x10⁻³ mol L⁻¹) indicam que os complexos não são eletrólitos⁸, ou seja, os cloretos estariam coordenados ao íon metálico. Os rendimentos das reações de síntese dos complexos (1-4), resultados de microanálises e condutividades molares são apresentados na Tabela 5.1.1.1.

Tabela 5.1.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão^a, análise elementar^b, massa molar (MM) e condutividade molar (DMF, 1x10⁻³ mol L⁻¹) dos complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (2) [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (4)

Composto	R (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	Fórmula mínima e MM (g mol ⁻¹)	A _M (Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
1	81,6	250,9-252,4 (198,2-200,0)	34,44 (34,85)	2,38 (2,47)	12,43 (12,51)	C ₁₃ H ₁₁ N ₄ S Cl ₂ Sb 447,98	20,15
2	78,3	238,6-240,5 (198,2-200,0)	29,79 (29,17)	1,46 (2,07)	9,75 (10,47)	C ₁₃ H ₁₁ N ₄ S Cl ₂ Bi 536,21	15,75
3	94,5	236,9-238,8 (171,4-173,9)	36,40 (36,20)	2,80 (2,84)	12,20 (12,13)	C ₁₄ H ₁₃ N ₄ S Cl ₂ Sb 462,01	22,79
4	92,1	253 (dec.) ^c (171,4-173,9)	30,13 (30,62)	2,64 (2,39)	10,50 (10,20)	C ₁₄ H ₁₃ N ₄ S Cl ₂ Bi 549,23	16,63

^a Pontos de fusão das tiossemicarbazonas livres se encontram entre parêntesis.

^b Valores teóricos se encontram entre parênteses.

^c Dec.: decomposição.

Espectros de Infravermelho

As vibrações atribuídas a ν(C=N) em 1588 e 1596 cm⁻¹ nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas livres deslocam-se para 1594-1611 cm⁻¹ nos espectros dos complexos

⁸ W.J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

(1-4), de acordo com a coordenação ao íon metálico pelo nitrogênio imínico⁹. As absorções referentes a $\nu(\text{CS})$ observadas em 774 e 783 cm^{-1} nos espectros das tiossemicarbazonas livres deslocam-se para 747-759 cm^{-1} nos espectros dos complexos (1-4), indicando a coordenação pelo enxofre. O deslocamento de 24-30 cm^{-1} é compatível com a complexação do enxofre na forma de tiolato¹⁰. O modo de deformação no plano do anel piridínico em 584 e 600 cm^{-1} nos espectros das tiossemicarbazonas não complexadas desloca-se para 601-632 cm^{-1} nos complexos (1-4), sugerindo a coordenação do nitrogênio piridínico (N_{py})¹¹.

Nos espectros de **1** e **3**, as absorções em 453 e 505 cm^{-1} , 432 e 428 cm^{-1} e 225 e 214 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Sb-N}_{\text{imina}})$, $\nu(\text{Sb-S})$ cm^{-1} e $\nu(\text{Sb-N}_{\text{py}})$ ^{12,13} respectivamente. Nos espectros de **2** e **4** as absorções em 512 e 510 cm^{-1} , 421 e 422 cm^{-1} e 200 e 202 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Bi-N}_{\text{imina}})$, $\nu(\text{Bi-S})$ ¹⁴ cm^{-1} e $\nu(\text{Bi-N}_{\text{py}})$, respectivamente. Dessa forma, nos complexos as tiossemicarbazonas estão coordenadas ao íon metálico através do sistema quelante $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imina}}\text{-S}$. Uma absorção associada a $\nu(\text{Sb-Cl})$ em 344 e 327 cm^{-1} foi observada nos espectros de **1** e **3**, enquanto que absorções associadas a $\nu(\text{Bi-Cl})$ foram encontradas em 333 e 332 cm^{-1} nos espectros de **2** e **4**.

Na Figura 5.1.1.3 são apresentados os espectros de infravermelho da tiossemicarbazona H2Ac4Ph e de seu complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac4Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**) obtidos em KBr na região de 4000-400 cm^{-1} . As atribuições de bandas selecionadas dos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas e seus complexos (1-4) são apresentadas na Tabela 5.1.1.2.

⁹ I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. Santos, P.R.O. Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 1454.

¹⁰ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263.

¹¹ D.X. West, J.S. Ives, J. Krejci, M.M. Salberg, T.L. Zumbahlen, G.A. Bain, A.E. Liberta, Polyhedron 14 (1995) 2189.

¹² H.D. Yin, J. Zhai, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 339.

¹³ H.D. Yin, J. Zhai, Y. Sun b, D. Wang, Polyhedron 27 (2008) 663.

¹⁴ H.P.S. Chauhan, N.M. Shaik, U.P. Singh, Appl. Organometal. Chem. 20 (2006) 142.

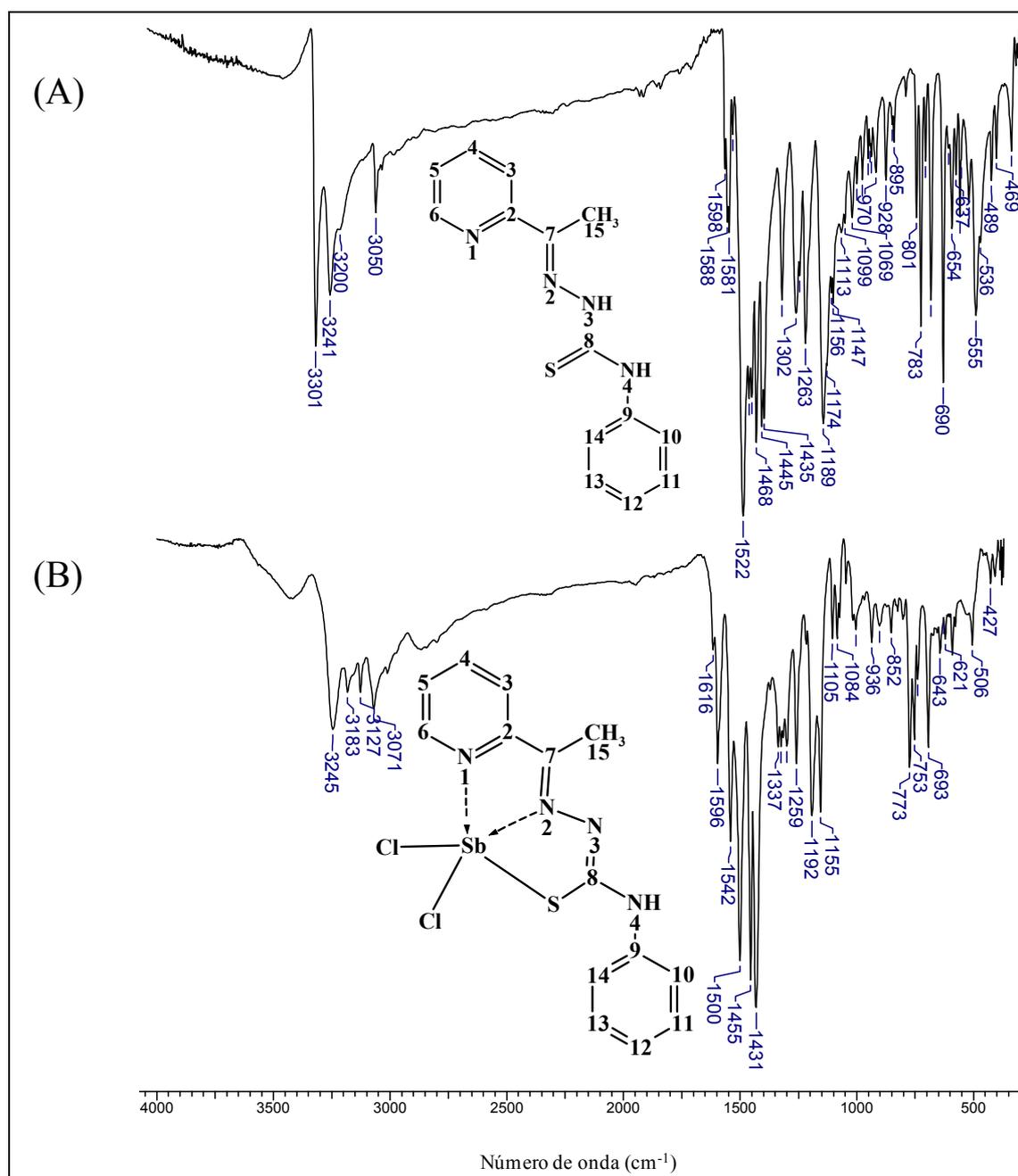


Figura 5.1.1.3. Espectros de infravermelho: A) da tiossemicarbazona H2Ac4Ph e B) do complexo [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (3).

Tabela 5.1.1.2. Atribuição de bandas selecionadas^a nos espectros de infravermelho (cm⁻¹) das tiossemicarbazonas H2Fo4Ph e H2Ac4Ph e de seus complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (1), [Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (2), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (3) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (4)

Composto	v(NH)	v(CN)	v(CS)	ρ(py)	v(MN)	v(MS)	v(MCl)	v(MN _{py})
H2Fo4Ph	3308F	1596F	774m	600f	-	-	-	-
1	3281m	1611F	750m	622f	453m	432m	344m	225f
2	3297F	1601F	747m	632f	512m	421m	333m	200f
H2Ac4h	3301F,3241F	1588F	783m	584f	-	-	-	-
3	3245m	1596F	753m	602f	505m	428m	327m	214f
4	3252F	1594F	759m	601f	510m	422m	332m	202f

^a As intensidades das bandas estão assinaladas como: F (forte), m (média) ou f (fraca).

Espectros de ressonância magnética nuclear

Os complexos (**1-4**) foram caracterizados por RMN de ^1H , utilizando-se $\text{MeOD-}d_4$ como solvente. Os espectros das tiossemicarbazonas $\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}$ e $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$ mostram os sinais de hidrogênio duplicados, indicando a presença dos isômeros *E* e *Z* com relação à ligação $\text{C}(7)=\text{N}(2)$, sendo o isômero *E* a espécie majoritária, correspondendo a 88% e 76%, respectivamente. Para os complexos (**1-4**), verifica-se o deslocamento de todos os sinais de hidrogênio das tiossemicarbazonas quando coordenadas, sendo os deslocamentos mais significativos encontrados para os hidrogênios piridínicos, sugerindo, portanto, a coordenação ao íon metálico pelo heteroátomo. Foi observado apenas um sinal para cada hidrogênio das tiossemicarbazonas nos espectros de **1-4**, indicando a presença de apenas um isômero na estrutura desses complexos. Uma vez que os nitrogênios amínicos não aparecem no espectro em $\text{MeOD-}d_4$, não é possível afirmar qual a configuração adotada pelos ligantes com a coordenação. Entretanto, dados de análise de **1-4** por infravermelho sugerem a coordenação das tiossemicarbazonas aos íons metálicos pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}-\text{N}_{\text{imina}}-\text{S}$, cuja configuração possível seria a configuração *E*.

Na Figura 5.1.1.4 é apresentado, como exemplo, o espectro de RMN de ^1H de $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**) em comparação com $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$. Os dados de RMN de ^1H de **1-4** em comparação com as tiossemicarbazonas livres são apresentados na Tabela 5.1.1.3.

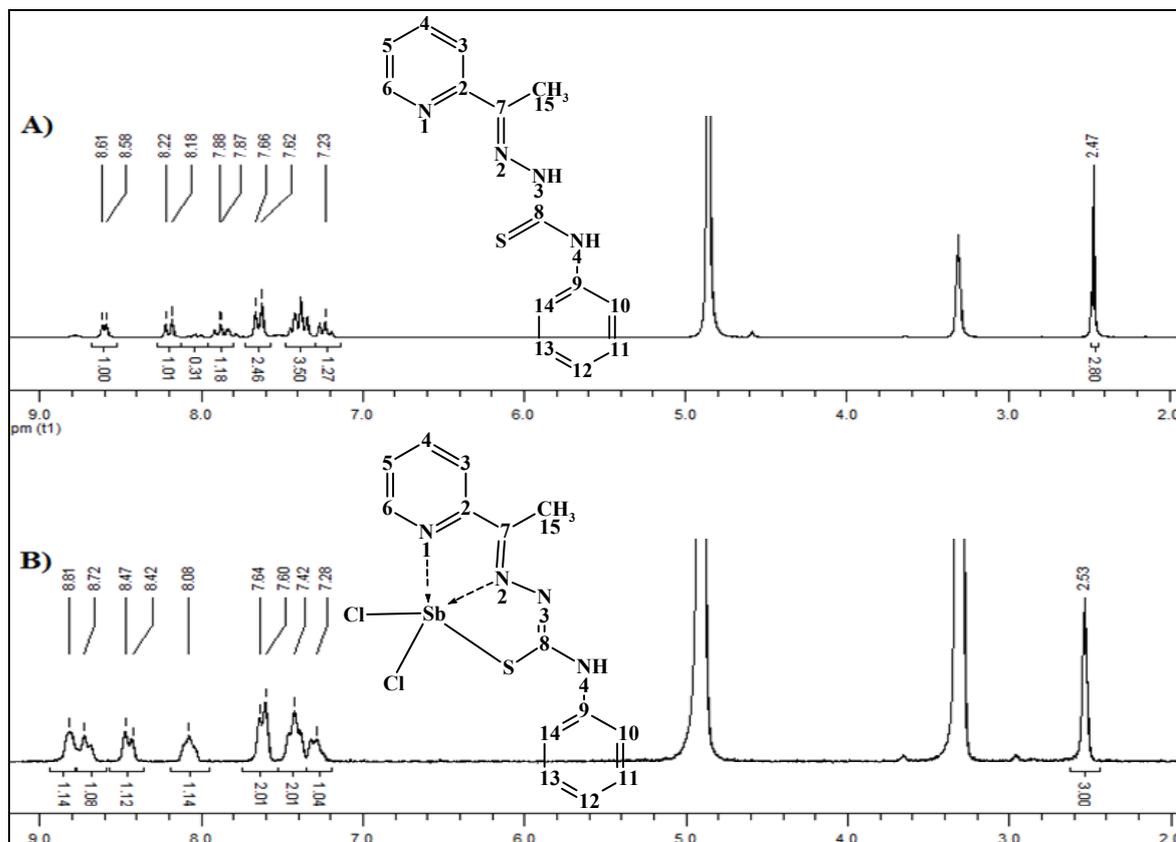


Figura 5.1.1.4. Espectros de RMN de ^1H : A) da tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$ e B) do complexo $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**), obtidos em $\text{MeOD-}d_4$.

Tabela 5.1.1.3. Atribuição, multiplicidade (M)^a, número de hidrogênios (n^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ¹H de [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**), Bi(2Fo4Ph)Cl₂] (**2**), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] (**4**) em comparação com H2Fo4Ph e H2Ac4Ph (MeOD-*d*₄)

Atribuição	n ^o	M	H2Fo4Ph (<i>E</i>)	(1)	(2)	n ^o	M	H2Ac4Ph (<i>E</i>)	(3)	(4)
H(6)	1	d	8,63	8,75	8,65	1	d	8,60	8,81	8,99
H(3)	1	d	7,94	8,22	8,10-7,90	1	d	8,20	8,45	8,35-8,20
H(4)	1	t	7,89	8,52	8,15	1	t	7,87	8,72	8,35-8,20
H(5)	1	t	7,50-7,33	7,92	7,62	1	t	7,38	8,08	7,79
H(7)	1	s	8,07	8,08	8,10-7,90	-	-	-	-	-
H(15)	-	-	-	-	-	3	s	2,47	2,53	2,81

^a s = simpleto; d = duplete, t = triplete.

5.1.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS

Monocristais de H2Fo4Ph na forma de cloridrato ([H₂Fo4Ph]Cl) foram obtidos do filtrado da síntese de **1** e monocristais dos complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]·2DMSO (**1a**), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂(DMSO)] (**4a**) foram obtidos pela dissolução de **1**, **3** e **4**, respectivamente, em DMSO. Os dados cristalográficos desses compostos foram coletados no difratômetro Oxford GEMINI a temperatura ambiente (293 K) no modo θ - 2θ . O resumo da coleção de dados e do refinamento^{15,16,17} das estruturas se encontra na Tabela 5.1.2.1. As estruturas determinadas para os compostos estão apresentadas nas Figuras 5.1.2.1 e as distâncias e ângulos de ligação se encontram nas Tabelas 5.1.2.2 e 5.1.2.3. Dados de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares são apresentados na Tabela 5.1.2.4.

A tiossemicarbazona [H₂Fo4Ph]Cl cristalizou-se na forma de cloridrato, em que a protonação ocorre no nitrogênio piridínico. Este composto apresenta conformação *EE*. Os átomos que compõem o esqueleto da tiossemicarbazona estão quase no mesmo plano do anel piridínico. Ambos os comportamentos são favorecidos pela presença das ligações de hidrogênio N(4)-H···Cl e N(1)-H···Cl. Os comprimentos de ligação entre os átomos que compõem o esqueleto da tiossemicarbazona estão de acordo com os de outras tiossemicarbazonas encontradas na literatura, como H2Ac4Ph¹⁸ e *N*(4)-morfolil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (Hmtsc)¹⁹ (ver Tabela 5.1.2.2).

Os complexos (**1a**), (**3**) e (**4a**) cristalizaram-se como moléculas neutras, nas quais as tiossemicarbazonas estão coordenadas a antimônio(III) e bismuto(III) sob a forma aniônica, através dos átomos N(1), N(2) e S(1). Duas moléculas de DMSO estão presentes em **1a** como

¹⁵ G.M. Sheldrick, SHELXS-97; Program for the Solution of Crystal Structures; University of Göttingen, Germany (1997).

¹⁶ G.M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany (1997).

¹⁷ L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst., 32 (1999) 837.

¹⁸ E. Bermejo, A. Castineiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D. X. West, Z. Anorg. Allg. Chem. 625 (1999) 961.

¹⁹ K. Nomiyama, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, N.C. Kasuga, H. Yokoyama, S. Nakano, K. Onodera. J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 601.

solvente de cristalização (Figura 5.1.2.1). O modo de coordenação das tiossemicarbazonas em **1a**, **3** e **4a** também foi observado nos complexos de antimônio(III) [Sb(mtsc)Cl₂] e de bismuto(III) [Bi(mtsc)₂NO₃]¹⁹ (Figura 5.1.2.2). Nas Tabelas 5.1.2.2 e 5.1.2.3 se encontram os comprimentos e ângulos de ligação selecionados para os compostos Hmtsc, [Sb(mtsc)Cl₂] e [Bi(mtsc)₂NO₃] para fins de comparação com as estruturas determinadas neste trabalho. Para facilitar a comparação entre as moléculas, foi considerada a numeração do esqueleto da tiossemicarbazona apresentada anteriormente na Figura 5.1.1.1.

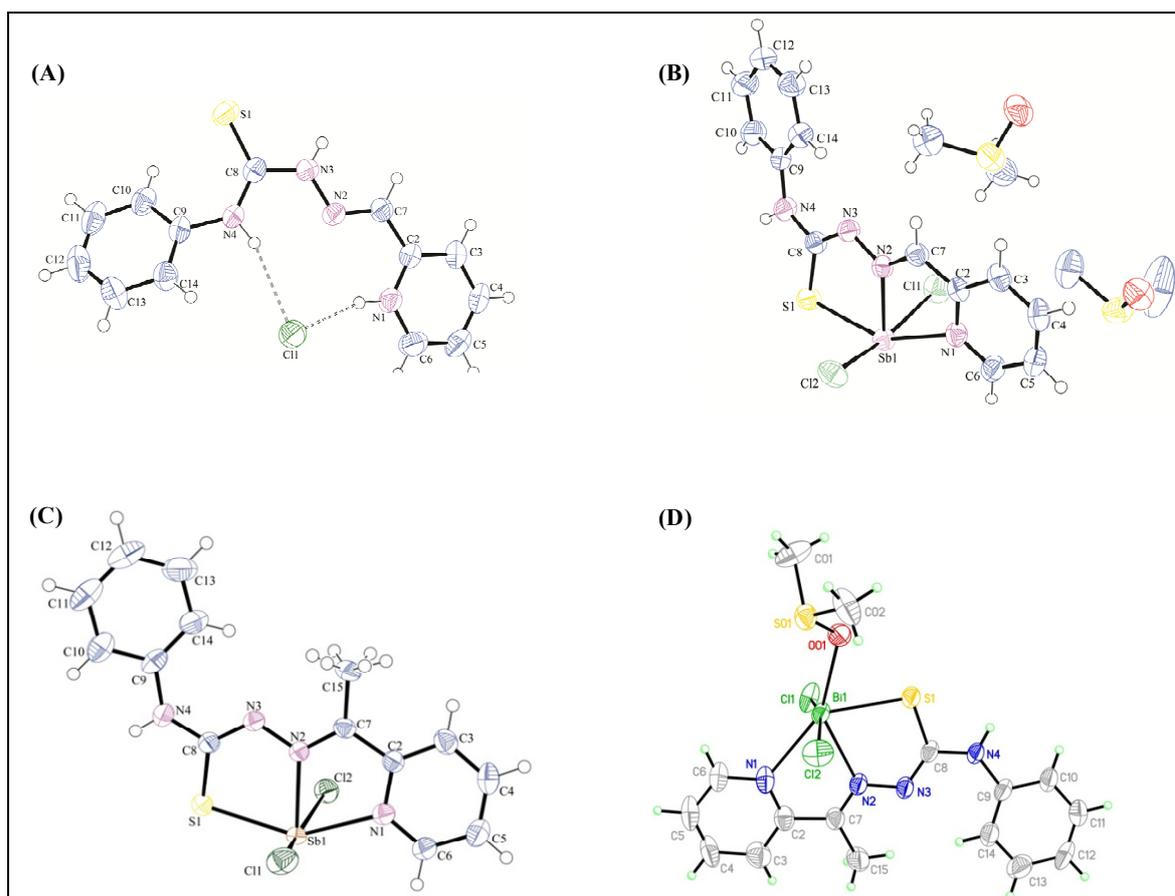


Figura 5.1.2.1. Diagrama ORTEP de: A) [H₂Fo4Ph]Cl, B) [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] \cdot 2DMSO (**1a**), C) [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**) e D) [Bi(2Ac4Ph)Cl₂(DMSO)] (**4a**).

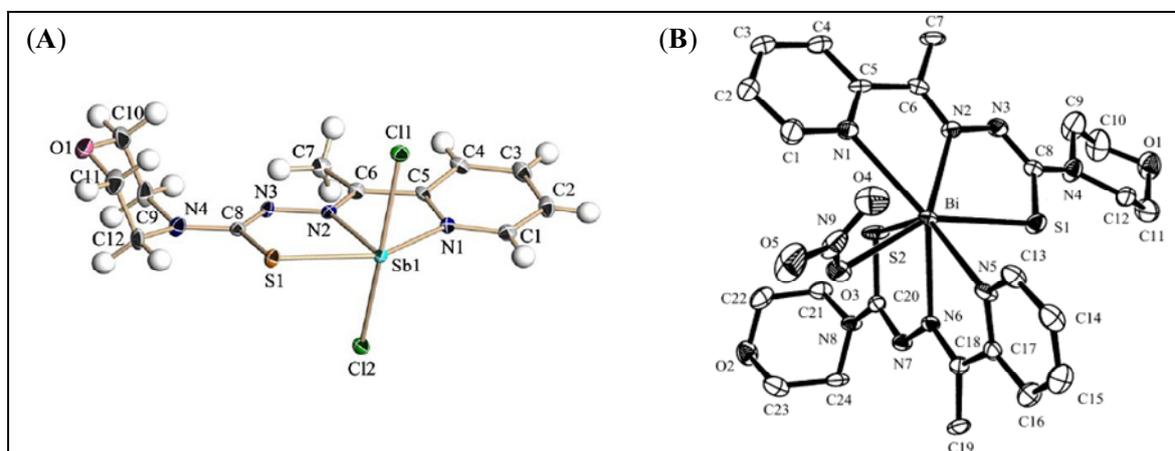


Figura 5.1.2.2. Diagrama ORTEP de: A) [Sb(mtsc)Cl₂] e B) [Bi(mtsc)₂NO₃]¹⁹.

Nos complexos de antimônio (**1a**) e (**3**), a geometria em torno do íon metálico é descrita como pirâmide de base quadrada distorcida, formada por três átomos (N_{py}-N_{imina}-S) do sistema quelante da tiossemicarbazona desprotonada em N(3) e por dois cloretos dispostos *trans* um ao outro. O íon central antimônio(III) está localizado no plano formado pelo sistema quelante da tiossemicarbazona, enquanto que os dois cloretos estão nas posições axiais. Os ângulos de Cl(1)-Sb(1)-Cl(2) são 162,87(3) para **1a** e 162,79(3) para **3**. Essa distorção em relação ao ângulo de octaedro perfeito se deve à existência do par de elétrons livres do íon metálico e à coordenação tridentada da tiossemicarbazona, formando dois anéis de cinco membros.

As tiossemicarbazonas se encontram coordenadas a antimônio(III) em **1a** e **3** na conformação *EZ* em relação às ligações C(7)=N(2) e N(3)-C(8). Verifica-se um aumento no comprimento da ligação C(8)-S(1), de 1,6659(17) e 1,677(2) Å em [H₂2Fo4Ph]Cl e H2Ac4Ph, para 1,736(3) e 1,750(3) (4) Å em **1a** e **3**, respectivamente, o que é compatível com a mudança da forma tiona (C=S) para a forma tiolato (C-S). Além disso, há um encurtamento da ligação N(3)-C(8), que passa de 1,369(2) e 1,358(3) Å em [H₂2Fo4Ph]Cl e H2Ac4Ph para 1,319(4) e 1,311(3) Å em **1a** e **3**, pois com a desprotonação de N(3) esta ligação passa a ter um caráter de dupla no complexo.

O complexo [Sb(mtsc)Cl₂] apresenta o mesmo ambiente de coordenação de **1a** e **3**. Verifica-se que as distâncias de ligação do metal e demais átomos a ele coordenados, assim como os ângulos de ligação em torno do íon metálico no complexo [Sb(mtsc)Cl₂] são similares aos do complexo (**3**). De fato, as tiossemicarbazonas nesses complexos são muito similares, diferindo apenas no grupo substituinte na posição N(4).

Interações fracas são observadas entre antimônio(III), N(4)-H e os átomos de oxigênio de moléculas de DMSO em **1a** (ver Figura 5.1.2.3). De acordo com o empacotamento de **3**, se verifica uma interação a curta distância entre antimônio(III) e Cl(2) de uma molécula vizinha, uma vez que a distância entre esses átomos é menor do que a soma de seus raios de van der Waals. Em **3** a ligação Sb(1)-Cl(1) é mais curta do que a ligação Sb(1)-Cl(2), provavelmente devido à interação entre Cl(2) e um íon antimônio(III) de uma molécula vizinha. Também são verificadas em **3** as interações intermoleculares N(4)-HN(4)···Cl(2) (ver Tabela 5.1.2.4).

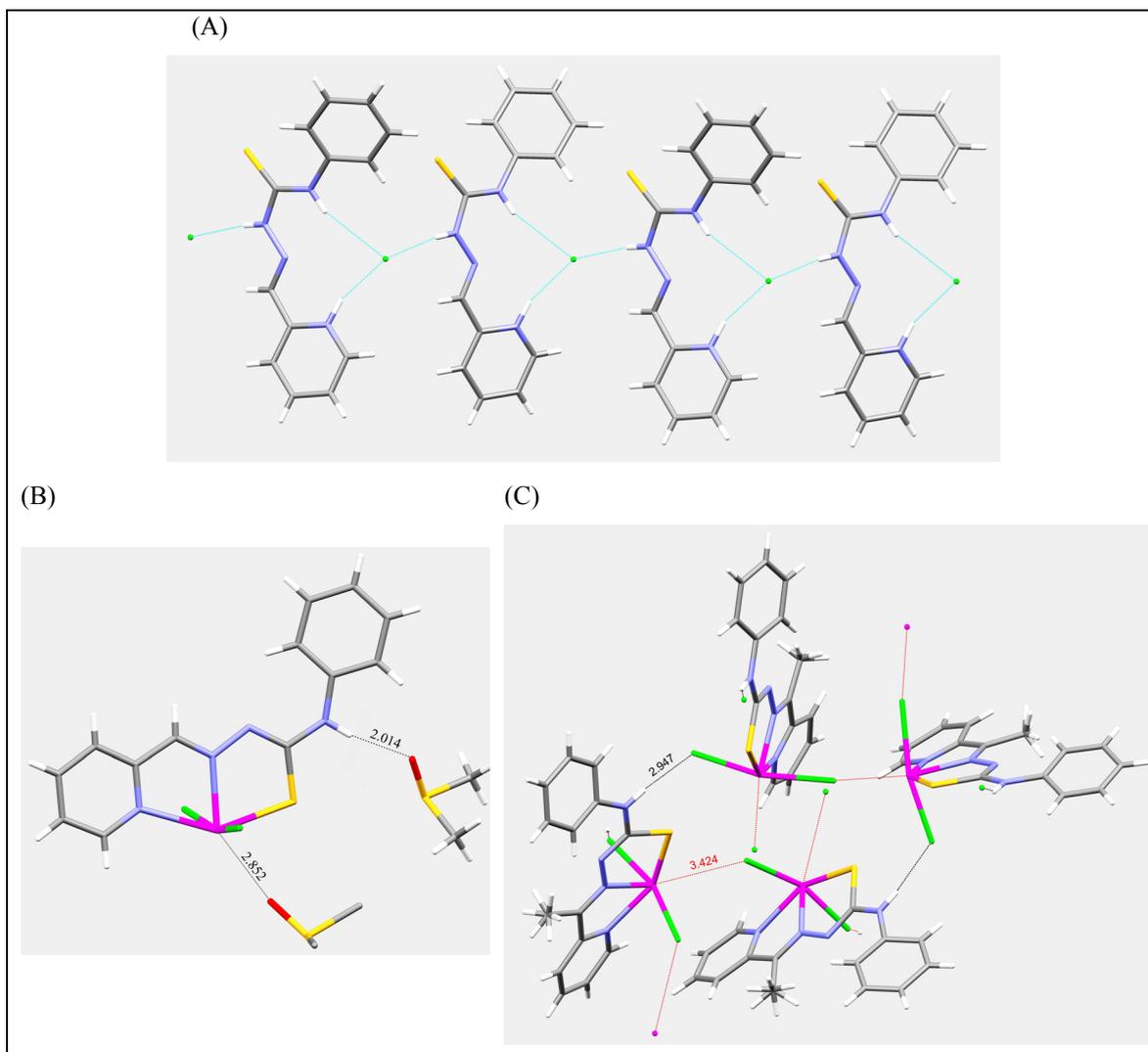


Figura 5.1.2.3. Empacotamento ou contatos a curta distância de: A) [H₂Fo4Ph]Cl, B) [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]·2DMSO (**1a**) e C) [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**).

Com relação ao complexo de bismuto (**4a**), bismuto(III) se encontra coordenado ao sistema N-N-S da tiossemicarbazona, a dois cloretos e ao oxigênio presente em uma molécula de DMSO. A estrutura do complexo é melhor descrita como uma estrutura dimérica, em razão da interação entre bismuto(III) e o cloreto de uma molécula vizinha. Neste caso, considera-se que o íon metálico encontra-se hepta-coordenado. A geometria em torno de bismuto(III) é bipirâmide de base pentagonal distorcida, em que as posições axiais são ocupadas por Cl(1) e Cl(2). As posições equatoriais são formadas pelos átomos N(1), N(2) e S(1) da tiossemicarbazona e pelo oxigênio do DMSO, enquanto que uma região livre na posição equatorial está direcionada ao cloreto de uma molécula vizinha (ver Figura 5.1.2.4).

Devido ao caráter de ácido de Lewis de bismuto(III), podem ocorrer interações intra e intermoleculares entre bismuto(III) e átomos doadores, aumentando, assim o número de coordenação do íon metálico²⁰. As ligações envolvendo o átomo de bismuto podem ser

²⁰ C. Silvestru, H. J. Breunig, H. Althaus, Chem. Rev. 99 (1999) 3277.

geralmente descritas em termos de ligações primárias (ligações covalentes normais) e ligações ou interações secundárias, cujas distâncias interatômicas são significativamente mais longas do que as ligações covalentes, porém são mais curtas do que a soma dos raios de van der Waals de dois átomos em questão, em que um deles é o bismuto²⁰.

O comportamento apresentado por **4a** é similar ao observado para complexos de cloreto de bismuto com ligantes doadores de oxigênio, como por exemplo, o complexo [Bi(diglima)Cl₃]²¹, cuja estrutura é mostrada na Figura 5.1.2.4.

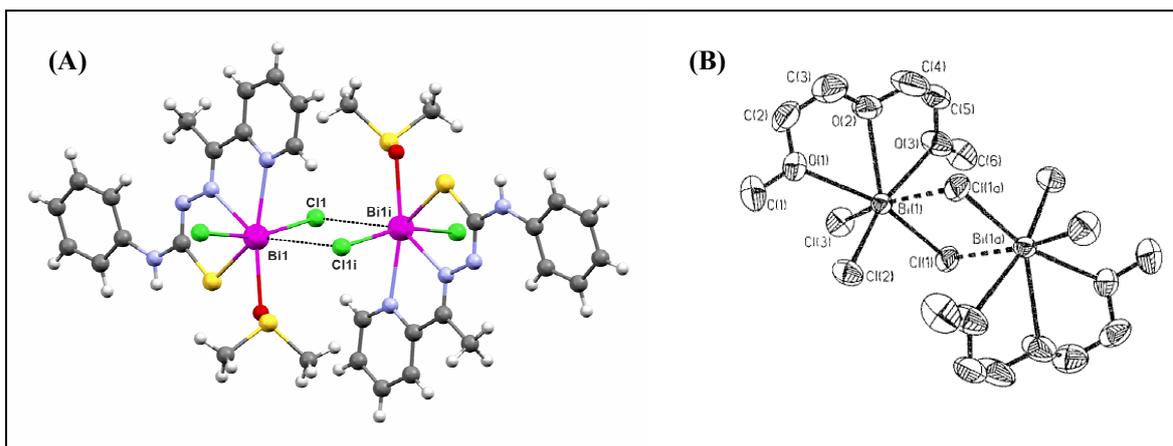


Figura 5.1.2.4. Contatos a curta distância de [Bi(2Ac4Ph)Cl₂(DMSO)] (**4a**) e [Bi(diglima)Cl₃]²¹, evidenciando interação entre bismuto(III) e Cl(1) (linhas pontilhadas), a qual é relevante para a formação de dímeros.

Com relação às ligações primárias, o comprimento da ligação Bi(1)–Cl(1) (2,7674(18) Å) é maior do que Bi(1)–Cl(2) (2,671(2) Å), possivelmente devido à interação de Cl(1) com bismuto(III) de uma molécula vizinha.

A ponte μ -Cl(1) é assimétrica, e a distância da ligação secundária Bi \cdots Cl(1) (3,128(2) Å) é maior do que a da ligação Bi–Cl(1) primária 2,7674(18) Å. Para Bi \cdots Cl(1), pode-se considerar a formação de uma ligação fraca entre os átomos, pois a distância entre eles é mais curta do que a soma de seus raios de van der Waals (4,2 Å)²⁰.

O ângulo entre os átomos Cl(1)–Bi(1)–Cl(2) é 163,99(7)°. O plano formado pelos átomos na posição equatorial N(1), N(2), S(1), Bi(1), O(01) (da molécula de DMSO) e Cl(1) (da molécula vizinha) apresenta um desvio médio de 0,2511 Å, sendo que os maiores desvios ocorrem para os átomos O(01) (-0,4816 Å) e Cl(1) (0,3802 Å).

Assim como nos complexos (**1a**) e (**3**), a tiossemicarbazona se encontra coordenada a bismuto(III) em **4a** na conformação *EZ* em relação às ligações C(7)=N(2) e N(3)–C(8), enquanto que H2Ac4Ph livre cristalizou-se na conformação *EE*. A conformação *EZ* nos complexos é favorecida pelo efeito quelato.

²¹ J.R. Eveland, K.H. Whitmire, Inorg. Chim. Acta 249 (1996) 41.

As principais mudanças nas ligações químicas da tiossemicarbazona com a coordenação envolvem a diminuição do comprimento da ligação N(3)–C(8) e o aumento do comprimento da ligação C(8)–S(1). Os ângulos entre as ligações foram afetados devido à mudança de conformação e às restrições geométricas provenientes da formação de anéis quelatos de cinco membros. Essas características também foram observadas para **1a** e **3**.

A ligação de hidrogênio intermolecular N(4)–H(4A)···Cl2ii (ii = transformação de simetria x-1, y, z) está presente no complexo (**4a**), gerando uma cadeia ao longo da direção (100) (Figura 5.1.2.5).

O complexo (**4a**) apresenta ambiente de coordenação diferente de [Bi(mtsc)₂NO₃]¹⁹, o qual reflete na diferença observada nos comprimentos das ligações entre o íon metálico e os átomos a ele coordenados. Entretanto, há semelhanças nos comprimentos e ângulos de ligação das tiossemicarbazonas coordenadas a bismuto(III), uma vez que o modo de coordenação tridentado de ambas ao íon metálico é similar nos dois complexos.

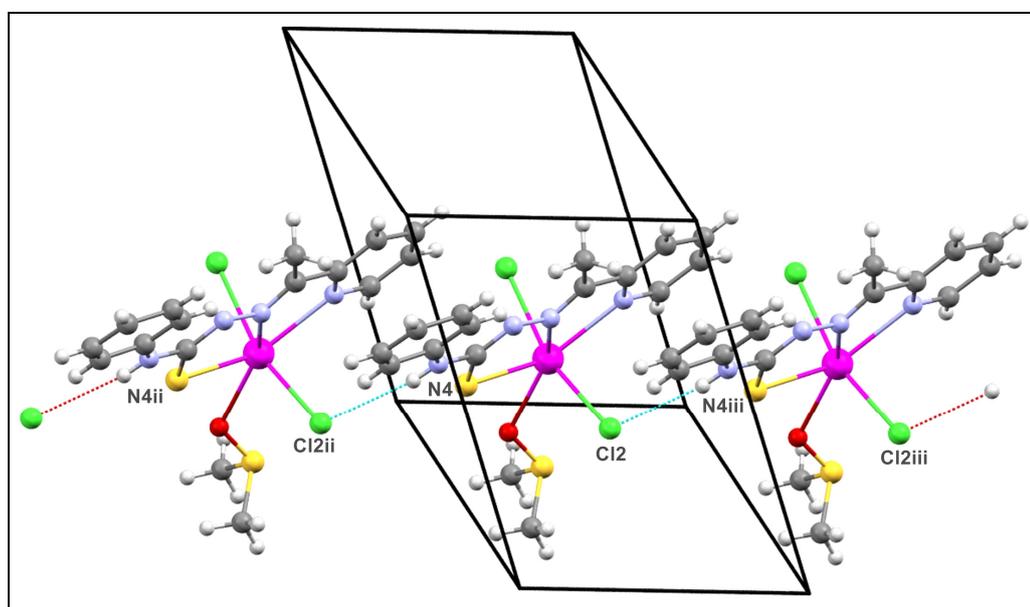


Figura 5.1.2.5. Empacotamento molecular de [Bi(2Ac4Ph)(DMSO)Cl₂] (**4a**), mostrando a cadeia ao longo da direção (100) formada pela ligação de hidrogênio N(4)–H(4A)···Cl₂ (linhas pontilhadas).

Tabela 5.1.2.1. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento de $[H_2FO_4Ph]Cl$, $[Sb(2FO_4Ph)Cl_2] \cdot 2DMSO$ (**1a**), $[Sb(2Ac_4Ph)Cl_2]$ (**3**) e $[Bi(2Ac_4Ph)(DMSO)Cl_2]$ (**4a**)

Composto	$[H_2FO_4Ph]Cl$	1a	3	4a
Fórmula molecular	$C_{13}H_{13}ClN_4S$	$C_{17}H_{25}Cl_2N_4O_2S_3Sb$	$C_{14}H_{13}Cl_2N_4SSb$	$C_{16}H_{19}Cl_2N_4OS_2Bi$
Dimensões do cristal, mm	0,22 x 0,12 x 0,08	0,20 x 0,14 x 0,10	0,18 x 0,08 x 0,04	0,59 x 0,13 x 0,02
Massa molecular, g mol ⁻¹	292,78	606,270	461,99	627,35
Comprimento de onda, Å	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	ortorrômbico	monoclínico	ortorrômbico	triclínico
Grupo de espaço	Pca2(1)	P2(1)/c	Pbca	P -1
Dimensões da célula a, Å	7,6886(2)	12,1753(2)	27,7334(9)	7,9293(2)
b, Å	13,9347(4)	21,6284(3)	8,2943(2)	10,3773(3)
c, Å	13,0320(3)	9,25140(10)	14,7677(4)	14,6909(4)
α , °	90	90	90	109,604(2)
β , °	90	90,7200(10)	90	90,301(2)
γ , °	90	90	90	108,125(2)
V (Å ³) / Z	1396,23(6)/4	2436,00(6)/4	3397,00(17)/8	1074,11(5)/2
F(000)	608	1184	2034	600
Densidade calc., g cm ⁻³	1,393	1,631	2,033	1,940
μ , mm ⁻¹	0,414	1,629	2,320	8,663
Intervalo de θ	2,92 – 29,56 deg	2,90 – 29,59	2,76-29,62	2,88-26,37
	-7 ≤ h ≤ 10	-16 ≤ h ≤ 15	-37 ≤ h ≤ 35	-9 ≤ h ≤ 9
Intervalo de hkl	-19 ≤ k ≤ 13	-26 ≤ k ≤ 28	-11 ≤ k ≤ 10	-12 ≤ k ≤ 12
	-17 ≤ l ≤ 15	-12 ≤ l ≤ 12	-20 ≤ l ≤ 19	-18 ≤ l ≤ 18
Completeza, %	99,9 (26,37°)	99,9 (26,37°)	100 (26,37°)	99,9 (26,37°)
Reflexões medidas	5737	28802	39720	23945
Reflexões únicas / R _{int}	3093/0,0204	6197/0,0280	4535/0,0528	4367/0,0678
Parâm. Ref. / restrições	172/1	275/0	199/0	235/0
R (obs/all)	0,0275/0,0414	0,0312/0,0469	0,0308/0,0620	0,0374/0,0446
wR (obs/all)	0,0541/0,0565	0,0907/ 0,0943	0,0643/0,0692	0,0967/0,0995
S	0,890	1,029	1,006	1,071
$\Delta\rho$ min/max (e Å ⁻³)	0,163/-0,132	1,034/-0,452	1,131/-0,536	3,365/-1,322

Tabela 5.1.2.2. Distâncias de ligação selecionadas (Å) de $[H_2FO_4Ph]Cl$, $[Sb(2FO_4Ph)Cl_2] \cdot 2DMSO$ (**1a**), $[Sb(2Ac_4Ph)Cl_2]$ (**3**) e $[Bi(2Ac_4Ph)Cl_2(DMSO)]$ (**4a**) em comparação com H_2Ac_4Ph ¹⁸, $Hmtsc$ ¹⁹, $[Sb(mtsc)Cl_2]$ ¹⁹ e $[Bi(mtsc)_2NO_3]$

Átomos ^a	$[H_2FO_4Ph]Cl$	1a	H2Ac4Ph	3	4a	Hmtsc	Sb(mtsc)Cl₂	[Bi(mtsc)₂NO₃]^b
M(1)–N(2)	-	2,250(2)	-	2,236(2)	2,455(5)	-	2,223(3)	2,606(4) / 2,495(4)
M(1)–N(1)	-	2,504(2)	-	2,358(2)	2,570(6)	-	2,350(3)	2,706(4) / 2,689(4)
M(1)–Cl(1)	-	2,5798(9)	-	2,6271(8)	2,7674(18)	-	2,6101(9)	-
M(1)–Cl(2)	-	2,5834(8)	-	2,5352(9)	2,671(2)	-	2,5403(10)	-
M(1)–S(1)	-	2,5050(8)	-	2,5345(8)	2,6205(16)	-	2,5361(10)	2,696(1) / 2,583(1)
O(01)–M(1)	-	-	-	-	2,544(4)	-	-	-
S(1)–C(8)	1,6659(17)	1,736(3)	1,677(2)	1,750(3)	1,738(7)	1,714(7)	1,749(4)	1,756(5) / 1,737(4)
N(2)–C(7)	1,280(2)	1,283(3)	1,284(3)	1,300(3)	1,278(9)	1,298(7)	1,313(5)	1,299(6) / 1,306(6)
N(2)–N(3)	1,3606(17)	1,373(3)	1,376(2)	1,367(3)	1,372(7)	1,351(6)	1,357(4)	1,366(5) / 1,367(4)
N(3)–C(8)	1,369(2)	1,319(4)	1,358(3)	1,311(3)	1,306(9)	1,348(7)	1,324(5)	1,305(6) / 1,312(6)
N(4)–C(8)	1,336(2)	1,345(3)	1,346(3)	1,347(4)	1,359(8)	1,352(7)	1,471(5)	1,366(5) / 1,360(5)

^aM = antimônio(III) ou bismuto(III); ^bOs dados correspondem aos comprimentos de ligação referentes às duas moléculas de tiossemicarbazona presentes na estrutura de $[Bi(mtsc)_2NO_3]$.

Tabela 5.1.2.3. Ângulos de ligação selecionados (Å) de $[H_2Fo_4Ph]Cl$, $[Sb(2Fo_4Ph)Cl_2] \cdot 2DMSO$ (**1a**), $[Sb(2Ac_4Ph)Cl_2]$ (**3**) e $[Bi(2Ac_4Ph)Cl_2(DMSO)]$ (**4a**) em comparação com H_2Ac_4Ph ¹⁸, Hmtsc, $[Sb(mtsc)Cl_2]$ ¹⁹ e $[Bi(mtsc)_2NO_3]$ ¹⁹

Átomos ^a	$[H_2Fo_4Ph]Cl$	1a	H2Ac4Ph	3	4a	Hmtsc	$[Sb(mtsc)Cl_2]$	$[Bi(mtsc)_2NO_3]$ ^b
N(2)–M(1)–N(1)	-	68,64(8)	-	69,42(8)	65,02(18)	-	70,69(11)	65,02(18)
N(1)–M(1)–S(1)	-	144,90(6)	-	145,74(6)	137,04(14)	-	147,06(8)	137,04(14)
N(2)–M(1)–Cl(1)	-	80,09(6)	-	81,43(6)	84,28(13)	-	80,93(8)	-
Cl(2)–M(1)–Cl(1)	-	162,87(3)	-	162,79(3)	163,99(7)	-	164,77(3)	-
N(2)–M(1)–Cl(2)	-	83,71(6)	-	84,40(6)	87,86(14)	-	86,08(8)	-
N(2)–M(1)–S(1)	-	76,38(5)	-	76,47(6)	72,15(13)	-	76,39(8)	72,15(13)
Cl(2)–M(1)–S(1)	-	89,60(3)	-	91,34(3)	98,35(7)	-	93,74(3)	-
S(1)–M(1)–Cl(1)	-	91,95(3)	-	94,78(3)	92,49(6)	-	-	-
S(1)–M(1)–O(01)	-	-	-	-	71,49(11)	-	-	-
Cl(1)–M(1)–O(01)	-	-	-	-	111,46(13)	-	-	-
Cl(2)–M(1)–O(01)	-	-	-	-	83,28(13)	-	-	-
O(01)–Bi(1)–Cl(1i) ^c	-	-	-	-	83,0(2)	-	-	-
N(1)–Bi–Cl(1i) ^c	-	-	-	-	73,2(1)	-	-	-
N(1)–Bi(1)–O(01)	-	-	-	-	150,23(17)	-	-	-
C(7)–N(2)–N(3)	116,84(14)	115,2(2)	118,8(2)	115,8(2)	115,4(5)	124,6(6)	115,3(3)	115,4(5)
N(2)–N(3)–C(8)	121,09(14)	115,8(2)	118,9(2)	116,7(2)	116,6(5)	111,1(5)	116,9(3)	116,6(5)
N(3)–C(8)–S(1)	116,48(13)	126,2(2)	119,7(1)	126,0(2)	127,9(5)	125,4(5)	125,1(3)	127,9(5)
S(1)–C(8)–N(4)	127,80(12)	115,1(2)	125,5(2)	115,2(2)	113,2(5)	121,0(4)	118,2(3)	113,2(5)
N(3)–C(8)–N(4)	115,69(14)	118,7(2)	114,8(2)	118,7(3)	118,9(6)	113,6(6)	116,7(4)	118,9(6)
C(8)–N(4)–C(9)	128,85(14)	130,2(2)	127,6(2)	130,0(3)	130,7(6)	123,6(5)	121,6(4)	130,7(6)

^a M = antimônio(III) ou bismuto(III).

^b Os dados correspondem aos comprimentos de ligação das duas moléculas de tiossemicarbazona presentes na estrutura de $[Bi(mtsc)_2NO_3]$.

^c O átomo Cl(1i) foi gerado pela transformação de simetria 1-x,1-y,1-z.

Tabela 5.1.2.4. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio calculados para [H₂2Fo4Ph]Cl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**3**) e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂(DMSO)] (**4a**)

Composto	D-H...A ^a	d(D-H)	d(H...A)	(D-H...A)	d(D-H...A)
[H ₂ 2Fo4Ph]Cl	N(3)-H(3A)···Cl(1A) [-x+3/2,y,z-1/2]	0,86	2,40	171,7	3,2544(15)
	N(4)-H(4A)···Cl(1)	0,86	2,68	157,3	3,4911(14)
	N(1)-H(1A)···Cl(1)	0,86	2,19	159,4	3,0147(14)
1a	N(4)-H(4A)···O(3A) [1 x,y,z+1]	0,86	2,01	163,9	2,848(3)
3	N(4)-H(4A)···Cl(2) [x,-y+1/2,z-1/2]	0,86	2,54	150,5	3,316(3)
4a	N(4)-H(4A)···Cl(2) [x-1,y,z]	0,86	2,75	165,6	3,592(6)

^a As transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes estão entre colchetes.

5.1.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Foi investigado o efeito de tiossemicarbazonas e complexos de antimônio(III) e de bismuto(III) sobre o crescimento bacteriano. Também foi investigada a atividade anti-*T. cruzi* de tiossemicarbazonas e complexos de antimônio(III).

Atividade antibacteriana

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) e bismuto(III) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram determinadas com o objetivo de avaliar os efeitos da coordenação sobre a ação antibacteriana. Os ensaios biológicos foram realizados em comparação com *N*(4)-fenil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph) e seus complexos de antimônio(III) e bismuto(III) [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**5**) e [Bi(2Bz4Ph)Cl₂] (**6**)²² (Tabela 5.1.3.1). A presença de diferentes substituintes em C(7) nas tiossemicarbazonas reflete em diferentes valores de logaritmo do coeficiente de partição óleo-água (logP) (ver Figura 5.1.3.1). Compostos que apresentam valores distintos de logP podem ter diferentes capacidades em penetrar no sistema biológico para assim promover o efeito desejado. LogP está relacionado, portanto, com a lipofilia de moléculas, sendo uma importante propriedade a ser considerada em análise de relações entre estrutura e atividade biológica.

²² D.C. Reis, J.A. Lessa, L.S. Azzolini, L.T. Paradizzi, C. Demicheli, S.M. Wardell, H. Beraldo, 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, QI-34, Fortaleza, 2009.

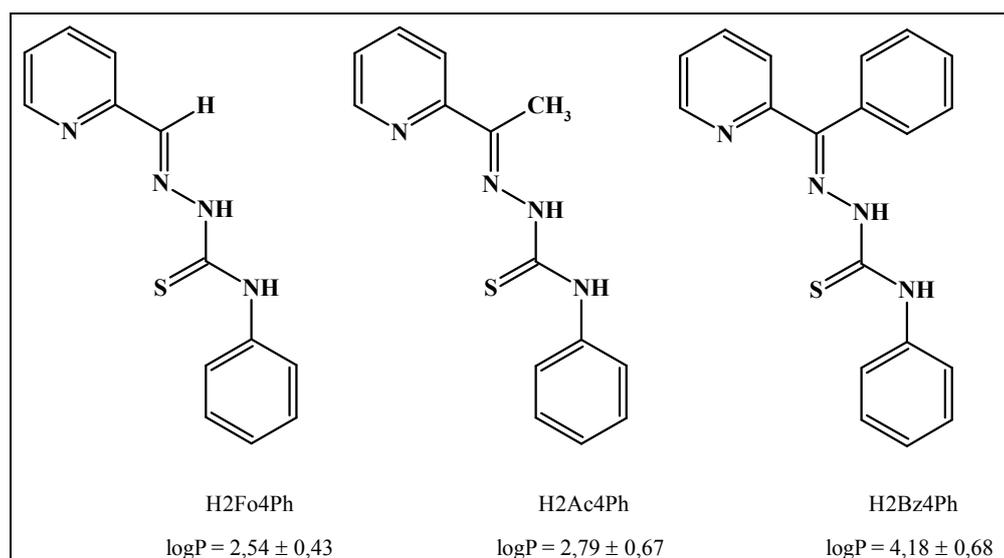


Figura 5.1.3.1. Estruturas e valores de logP calculados para as tiossemicarbazonas H2Fo4Ph, H2Ac4Ph e H2Bz4Ph.

Tabela 5.1.3.1. Concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* das tiossemicarbazonas, seus complexos de antimônio(III) e bismuto(III), SbCl_3 , BiCl_3 e de cloridrato de tetraciclina

Composto	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
H2Fo4Ph	190,0	397,0
[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1)	57,5	223,0
[Bi(2Fo4Ph)Cl ₂] (2)	6,1	96,0
H2Ac4Ph	370,0	45,0
[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3)	108,0	121,0
[Bi(2Ac4Ph)Cl ₂] (4)	5,7	93,2
H2Bz4Ph	75,9	76,0
Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (5)	90,0	96,4
Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	5,5	93,2
SbCl_3	124,0	1095,0
BiCl_3	ND ^a	ND ^a
Cloridrato de tetraciclina	0,3	29

^a ND: não determinado. Não foi possível determinar a CIM de BiCl_3 contra as cepas, pois o composto é insolúvel.

Tiossemicarbazonas e complexos apresentam atividade contra as cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Na maioria dos casos, a bactéria gram-positiva foi mais sensível do que a gram-negativa. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que a parede celular da bactéria *P. aeruginosa* apresenta uma membrana extra, o que poderia dificultar a penetração dos compostos. O composto H2Bz4Ph foi a tiossemicarbazona que apresentou maior atividade contra *S. aureus*, provavelmente devido à sua maior lipofilia. Entretanto, não foi possível fazer a mesma relação entre lipofilia e atividade das tiossemicarbazonas contra *P. aeruginosa*.

A diminuição da CIM contra *P. aeruginosa* com relação às tiossemicarbazonas livres foi verificada apenas para os complexos (1) e (2). No entanto, com exceção do complexo (5), a

coordenação a antimônio(III) e bismuto(III) resultou em aumento da ação antibacteriana contra *S. aureus* em relação à tiossemicarbazonas livres, sendo que os complexos de bismuto(III) foram os mais ativos. O complexo (2), por exemplo, foi cerca de sessenta e cinco vezes mais ativo do que a tiossemicarbazona H2Ac4Ph.

O sal BiCl_3 é insolúvel, de forma que não foi possível determinar a atividade antimicrobiana intrínseca do íon metálico. A coordenação de tiossemicarbazonas a bismuto(III), portanto, possibilitou a obtenção de compostos mais solúveis e provavelmente facilitou a incorporação do íon metálico pelos microorganismos. O efeito deve-se provavelmente ao complexo como uma entidade ou a uma ação sinérgica ligante-metal.

Uma vez que a bactéria gram-positiva foi mais sensível aos compostos do que a bactéria gram-negativa e a coordenação a bismuto(III) promoveu maior diminuição da CIM do que a coordenação a antimônio(III) contra *S. aureus*, foi investigada a ação de tiossemicarbazonas e seus complexos de bismuto(III) contra outras duas cepas de bactérias gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Os valores de CIM contra *S. epidermidis* e *E. faecalis* para os compostos estão listados na Tabela 5.1.3.2, juntamente com os valores de fármacos controle cloridrato de tetraciclina e ciprofloxacina e em comparação com os valores de CIM contra *S. aureus*.

Tabela 5.1.3.2. Concentração inibitória mínima (CIM) contra bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* das tiossemicarbazonas, seus complexos de bismuto(III), cloridrato de tetraciclina e ciprofloxacina

Composto	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
H2Fo4Ph	190,0	>386,24	>401,84
[Bi(2Fo4Ph)Cl ₂] (2)	6,1	98,84	23,78
H2Ac4Ph	370,0	179,40	384,69
[Bi(2Ac4Ph)Cl ₂] (4)	5,7	91,95	22,76
H2Bz4Ph	75,9	>302,92	>308,92
[Bi(2Bz4Ph)Cl ₂] (6)	5,5	82,61	40,08
Cloridrato de tetraciclina	0,3	-	-
Ciprofloxacina	-	0,62	1,25

Da mesma forma que a coordenação a bismuto(III) resultou em compostos mais ativos contra *S. aureus*, o mesmo efeito foi verificado no estudo da atividade dos compostos contra *S. epidermidis* e *E. faecalis*. No entanto, foram observadas diferentes sensibilidades das bactérias aos complexos metálicos. A ordem de sensibilidade aos complexos (2), (4) e (6) foi a mesma: *S. aureus* > *E. faecalis* > *S. epidermidis*. Embora a sensibilidade aos complexos seja diferente para cada cepa, se verifica que em uma mesma cepa, em geral os complexos apresentam similares valores de CIM, apesar de esses compostos provavelmente apresentarem diferentes lipofilias. Possivelmente, a capacidade das tiossemicarbazonas em coordenar ao bismuto(III) e assim funcionar como carreadoras do íon metálico para o sistema microbiano seja o fator relevante para promover o aumento da atividade antibacteriana.

A coordenação a bismuto(III) constituiu, portanto, uma estratégia interessante de redução de doses contra as bactérias *gram*-positivas, enquanto que o mesmo não foi observado para a bactéria *gram*-negativa. O estudo sugere que o íon metálico exerce um papel importante na atividade antimicrobiana dos compostos.

Atividade anti-*T. cruzi*

É conhecido o uso de compostos de antimônio para o tratamento de leishmaniose. Uma vez que ambas as doenças de Chagas e leishmaniose são causadas por protozoários, foi investigada a ação de tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) sobre as formas epimastigota e tripomastigota do protozoário *Trypanosoma cruzi*. Na Tabela 5.1.3.3 são apresentados os valores de concentração dos compostos que inibem em 50% (CI₅₀) o crescimento de células sadias (citotoxicidade) e das formas tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*. Curvas dose-resposta foram obtidas para todos os compostos, porém, em alguns casos não foi possível determinar os valores de CI₅₀.

Tabela 5.1.3.3. Citotoxicidade^a e atividade anti-*T. cruzi* de H2Fo4Ph, H2Ac4Ph e H2Bz4Ph, seus complexos de antimônio(III) e SbCl₃ em comparação com os fármacos de referência benznidazol e nifurtimox

Composto	CI ₅₀ (μmol L ⁻¹)		
	Citotoxicidade	tripomastigota	epimastigota
H2Fo4Ph	<1	ND ^b	ND ^b
[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1)	<1	1,27	1,23
H2Ac4Ph	<1	ND ^b	52,78
[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (3)	<1	1,23	ND ^b
H2Bz4Ph	<3,00	14,41	ND ^b
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (5)	<1,91	8,39	2,10
SbCl ₃	<4,38	65,75	6,79
Benznidazol	96,06	6,26	6,65
Nifurtimox	3,48	2,75	1,88

^a Testes de citotoxicidade foram realizados com esplenócitos isolados de camundongos BALB/c.

^b ND: Não determinado. Não foi possível determinar a CI₅₀ a partir de curvas de dose-resposta obtidas.

A tiossemicarbazona H2Fo4Ph mostrou-se altamente citotóxica. Porém, não foi possível determinar sua atividade contra ambas as formas do ciclo do parasita. Seu complexo de antimônio (1) exibiu atividade contra ambas as formas tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi* com valores similares de CI₅₀ (~1,2 μmol L⁻¹), os quais são inferiores aos valores de CI₅₀ determinados para nifurtimox e benznidazol contra ambas as formas. No entanto, 1 é citotóxico em concentrações mais baixas.

H2Ac4Ph foi ativo em elevada concentração (CI₅₀ = 52,8 μmol L⁻¹) contra a forma epimastigota, sendo citotóxico em concentração menor do que 1 μmol L⁻¹. O complexo (3) foi mais ativo do que nifurtimox e benznidazol contra a forma tripomastigota, porém também mostrou-se citotóxico em concentração menor do que 1 μmol L⁻¹.

H2Bz4Ph foi moderadamente ativo contra a forma tripomastigota ($CI_{50} = 14,41 \mu\text{mol L}^{-1}$). Seu complexo (5), bem como o sal de antimônio, foram mais ativos contra a forma epimastigota do que contra a forma tripomastigota.

Portanto, em geral os complexos apresentaram atividade anti-*T. cruzi*, sendo mais ativos do que o sal $SbCl_3$. Os complexos (1) e (3) foram mais ativos do que os fármacos de referência nifurtimox e benznidazol. Entretanto, nenhum dos compostos se revelou bom candidato a fármaco anti-*T. cruzi*, devido à sua alta citotoxicidade.

5.2 Complexos de ouro(I) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4DH), seus derivados N(4)-metil- (H2Ac4Me) e N(4)-fenil- (H2Ac4Ph) substituídos e N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph)

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE OURO(I)

Foram sintetizados os complexos de ouro(I): $[Au(H_2Ac_4DH)Cl] \cdot CH_3OH$ (1) $[Au(H_2Ac_4Me)Cl]Cl$ (2), $[Au(H_2Ac_4Ph)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ (3) e $[Au(H_2Bz_4Ph)Cl]Cl$ (4) com 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4DH), seus derivados N(4)-metil- (H2Ac4Me) e N(4)-fenil- (H2Ac4Ph) substituídos, e com N(4)-fenil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4Ph) (Figuras 5.2.1.1 e 5.2.1.2). Os produtos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por seus espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Os complexos (1) e (3) também foram caracterizados por termogravimetria. Foram obtidos cristais a partir dos filtrados das reações de síntese de 1 e 4 e as estruturas foram determinadas por difração de raios X de monocristal (ver seção 5.2.2).

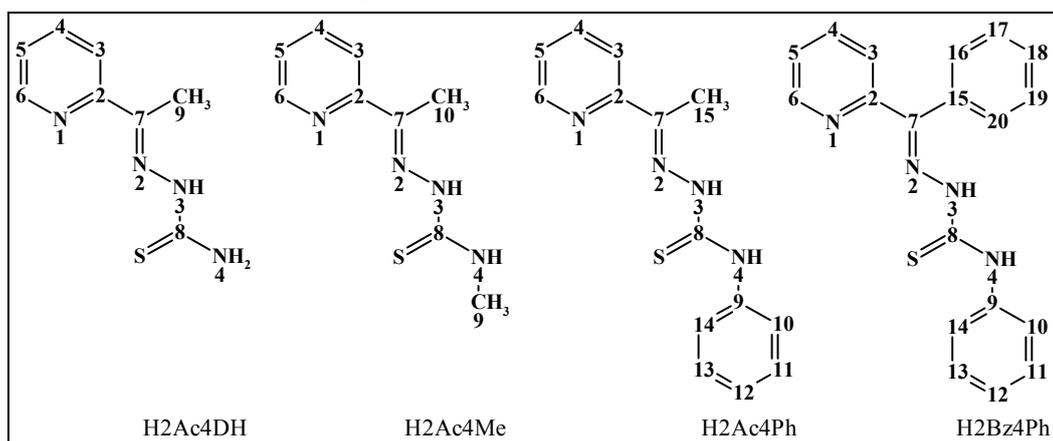


Figura 5.2.1.1. Estruturas das tiossemicarbazonas H2Ac4DH, H2Ac4Me, H2Ac4Ph e H2Bz4Ph, as quais foram utilizadas nas sínteses dos complexos (1-4), e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

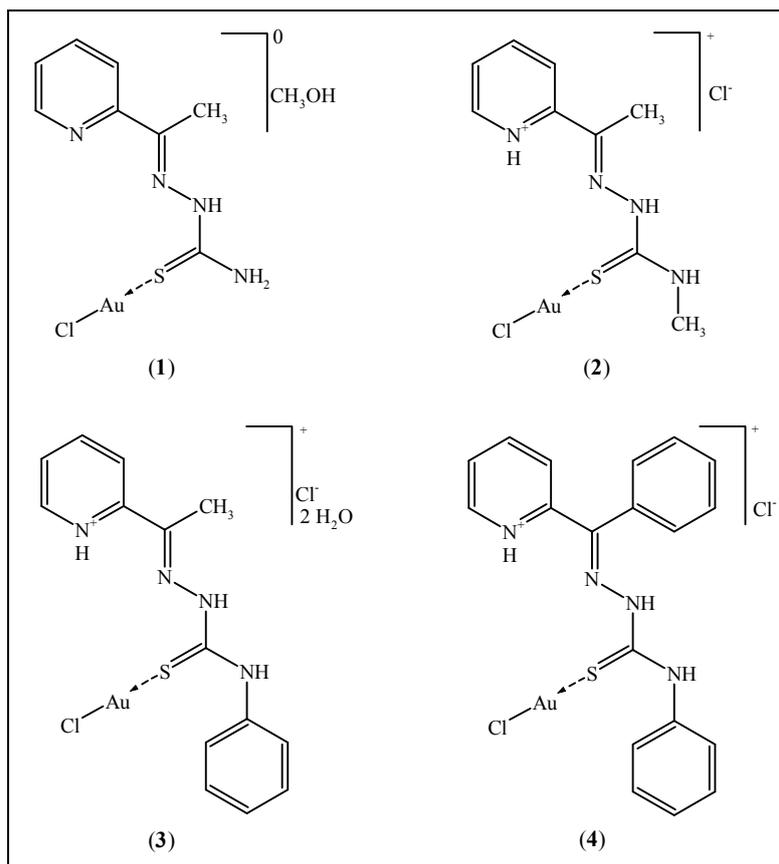


Figura 5.2.1.2. Estruturas dos complexos $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH})\text{Cl}]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ (2), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4).

Microanálises, massas molares e condutividade molar

Os rendimentos das reações de síntese dos complexos (1-4), a massa molar, resultados de microanálises e condutividades molares são apresentados na Tabela 5.2.1.1.

Os resultados das análises sugerem que no complexo (1) a tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH}$ está coordenada em sua forma neutra ao íon metálico, juntamente com um ligante cloreto. Os complexos (2-4) apresentam estruturas do tipo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}]\text{Cl}$ em que H_2L representa as tiossemicarbazonas coordenadas ao íon metálico na forma catiônica (ver Figura 5.2.1.2). A proposta da presença de tiossemicarbazonas nas formas catiônicas nas estruturas dos complexos (2-4) é amparada por dados de infravermelho e por dados cristalográficos obtidos para o complexo (4) (seção 5.2.2). As análises condutimétricas (metanol $\sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) indicam que o complexo (1) é neutro, enquanto que os complexos (2-4) são eletrólitos 1:1⁸. A condutividade dos complexos (2-4) está associada à presença de tiossemicarbazonas na forma de cloridratos (ver Figura 5.2.1.2).

Durante a reação de síntese dos complexos (1-4), ocorreu a redução de ouro(III) para ouro(I), sendo esse comportamento observado na obtenção de outros complexos de ouro²³. É possível que as tiossemicarbazonas tenham reduzido o íon ouro(III), considerando-se que essas

²³ I.G. Santos, A. Hagenbach, U. Abram, Dalton Trans. (2004) 677.

moléculas exibem propriedades redutoras²⁴. Entretanto, uma vez que os complexos foram obtidos com bons rendimentos, é possível também que tenha ocorrido redução de ouro(III) com a oxidação de metanol durante a síntese.

De acordo com a análise elementar e a curva termogravimétrica (curva TG), uma molécula de metanol de cristalização está presente no complexo (1). A curva TG mostra a perda de 6,7% de massa entre 98,92 e 193,90 °C, enquanto que o valor teórico de percentual de massa do metanol é 7,0%. No complexo (3), duas moléculas de água de hidratação estão presentes. A curva TG mostra uma perda de massa de 6,1% entre 95,2 e 192,8 °C enquanto que o valor teórico corresponde a 6,3%. Como exemplo, na Figura 5.2.1.3 é apresentada a curva TG obtida para o complexo (1).

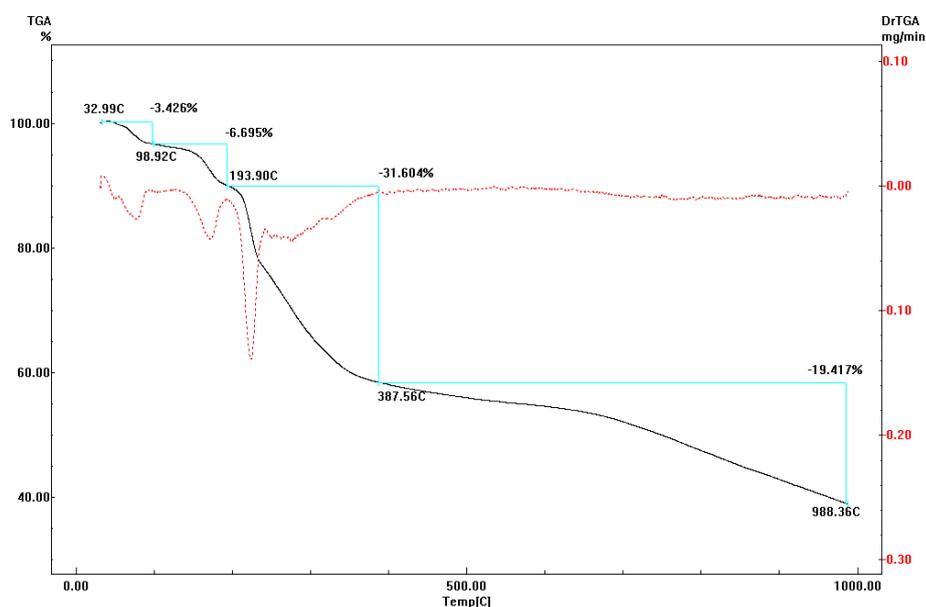


Figura 5.2.1.3. Curvas TG e DTG obtidas para o complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH})\text{Cl}]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (1) (31-1000 °C, razão de aquecimento 10 °C/min, N_2).

Tabela 5.2.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão^a, análise elementar^b, massa molar (MM) e condutividade molar^c (metanol, 1×10^{-3} mol L^{-1}) dos complexos de ouro(I) $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH})\text{Cl}]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ (2), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4)

Composto	R (%)	Ponto de fusão (°C)	% C	% H	% N	Fórmula mínima e MM (g mol ⁻¹)	Λ_M ($\Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
1	58,0	178,8-180,3 (156,4-158,2)	23,84 (23,56)	3,05 (3,08)	12,07 (12,21)	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{ClN}_4\text{SOAu}$ 458,72	49,73
2	64,7	163,7-164,5 (174,2-175,1)	22,91 (22,65)	2,68 (2,75)	11,51 (11,74)	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SAu}$ 477,16	127,42
3	95,4	161,5-164,1 (171,4-173,9)	29,36 (29,23)	3,11 (3,33)	9,54 (9,74)	$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SAu}$ 575,26	90,29
4	60,4	189,4-190,8 (142,9-144,5)	37,73 (37,95)	2,74 (2,85)	9,31 (9,32)	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SAu}$ 601,30	111,95

^a Pontos de fusão dos respectivos ligantes.

^b Valores teóricos entre parênteses.

²⁴ R.H.U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 65 (1997) 267.

Espectros de Infravermelho

As absorções referentes a $\nu(\text{C}=\text{S})$ observadas em $802\text{-}774\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas livres deslocam-se para $797\text{-}755\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos (1-4). O pequeno deslocamento sugere a coordenação pelo enxofre na forma de tiona²⁵. A absorção forte e larga observada em $2920\text{-}2682\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos (2-4) foi atribuída ao estiramento $\nu(\text{N}_{\text{py}}\text{-H})$ da piridina protonada²⁶. Novas absorções foram observadas nos espectros dos complexos (1-4) em $363\text{-}330\text{ cm}^{-1}$ e $370\text{-}348\text{ cm}^{-1}$, as quais foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Au-Cl})$ ^{27,28} e $\nu(\text{Au-S})$ ²⁹ cm^{-1} , respectivamente. Os resultados sugerem, portanto, que o íon ouro(I) está coordenado ao átomo de enxofre das tiossemicarbazonas e a um íon cloreto.

Uma absorção larga em $3200\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ no espectro do complexo (1) e em torno de 3380 cm^{-1} no espectro do complexo (3) foi atribuída à vibração $\nu(\text{O-H})$.

Na Figura 5.2.1.4 são apresentados como exemplo, os espectros de infravermelho da tiossemicarbazona H2Bz4Ph e de seu complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz4Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4) na região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Atribuições de bandas selecionadas no espectro de infravermelho dos complexos (1-4) são apresentadas na Tabela 5.2.1.2.

Tabela 5.2.1.2. Atribuição de bandas selecionadas^a nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das tiossemicarbazonas e de seus complexos de ouro(I) (1-4)

Composto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{N}_{\text{py}}\text{-H})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MS})$	$\nu(\text{MCl})$
H2Ac4DH	3373F, 3233m	-	1599F	780m	620f	-	-
1	3284m, 3240m	-	1623F	775m	621f	348f	330f
H2Ac4Me	3289F	-	1579F	781m	621f	-	-
2	3284m	2910F	1592F	775m	622f	362f	344f
H2Ac4Ph	3301F, 3241F	-	1600F	802m	584f	-	-
3	3230m	2920F	1619F	797m	602f	370f	363f
H2Bz4Ph	3301F	-	1594F	788m	614f	-	-
4	3226m	2682F	1618F	778m	615f	369f	351f

^a As intensidades das bandas estão assinaladas como: F (forte), m (média) ou f (fraca).

²⁵ A. Castiñeiras, R. Pedrido, G. Pérez-Alonso, Eur. J. Inorg. Chem. (2008) 5106.

²⁶ B. Chenon, C. Sandorfy, Canad. J. Chem. 36 (1958) 1181.

²⁷ K. Ortner, U. Abram, Polyhedron 18 (1999) 749.

²⁸ A. Garza-Ortiz, J. Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A.L. Spek, J. Reedijk, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 1922.

²⁹ J.S. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, J. Ellena, A. Sánchez, J. Sordo, C. Taboada, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1858.

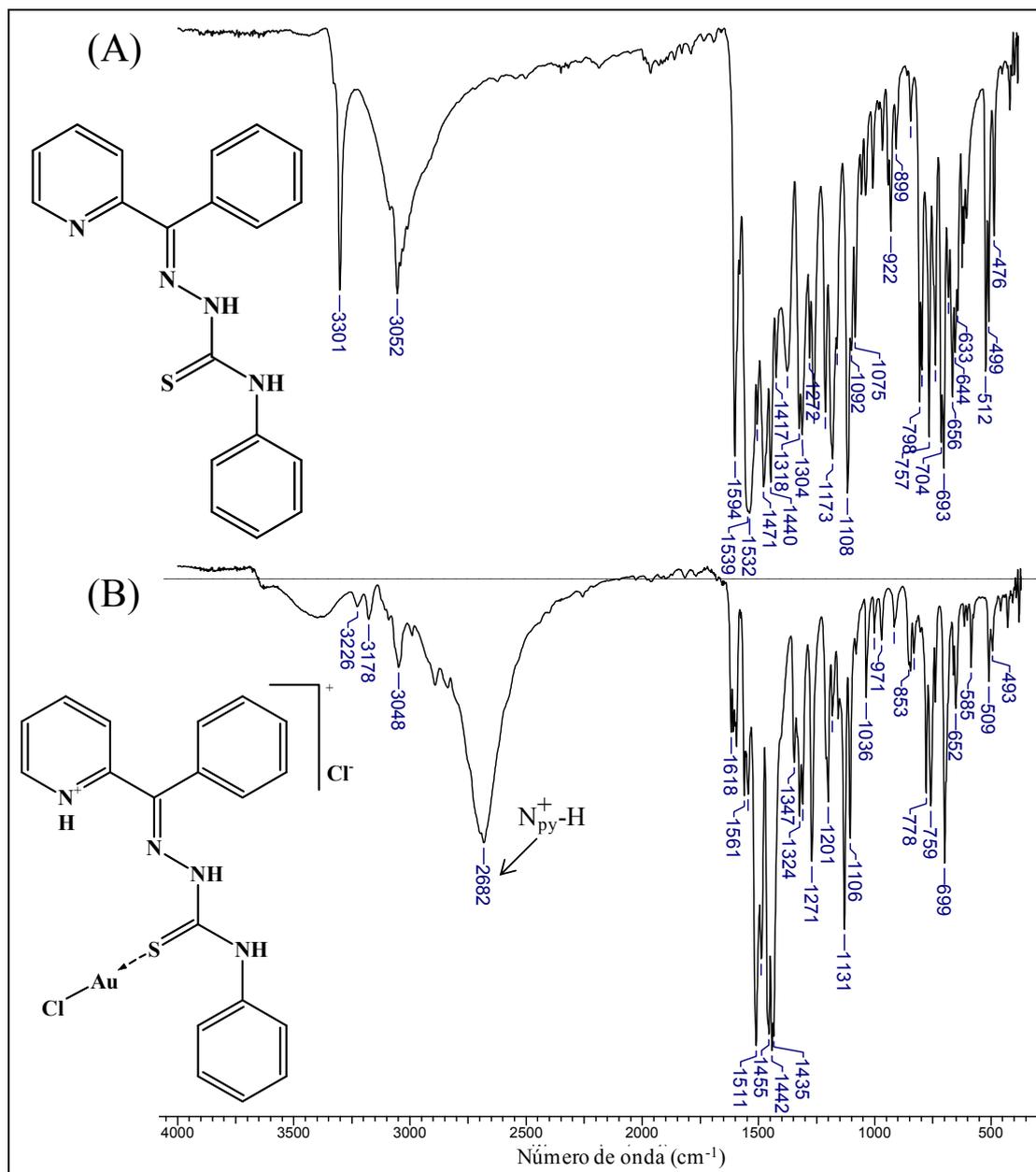


Figura 5.2.1.4. Espectros de infravermelho A) da tiossemicarbazona H₂Bz₄Ph e B) do complexo [Au(H₂Bz₄Ph)Cl]Cl (4).

Espectros de ressonância magnética nuclear

Soluções dos complexos (1-4) em DMSO-*d*₆ foram analisadas por RMN de ¹H e verificou-se que todos os complexos reagem com o solvente deuterado. No entanto, apesar de os complexos serem instáveis em DMSO-*d*₆, os espectros obtidos nesse solvente forneceram informações importantes, como a mudança do deslocamento dos sinais das tiossemicarbazonas com a complexação e a permanência do sinal de N(3)-H, sugerindo que as tiossemicarbazonas não desprotonam quando coordenadas ao íon metálico. Também foi observado que todos os sinais de N(3)-H das tiossemicarbazonas são correspondentes à configuração *E*, indicando que para os complexos (1-3), as tiossemicarbazonas mantêm a configuração quando coordenadas,

enquanto que no complexo (4), a tiossemicarbazona, que quando livre encontra-se principalmente na forma do isômero *Z* (70% em DMSO-*d*₆), muda para a configuração *E* com a coordenação. Além disso, está presente nos espectros de alguns complexos um sinal em torno de 16 ppm, o qual possivelmente corresponde ao nitrogênio piridínico protonado (N(1)-H). Como exemplos, são apresentados os espectros de H2Ac4Me e de seu complexo (2) obtidos em DMSO-*d*₆ (Figura 5.2.1.5).

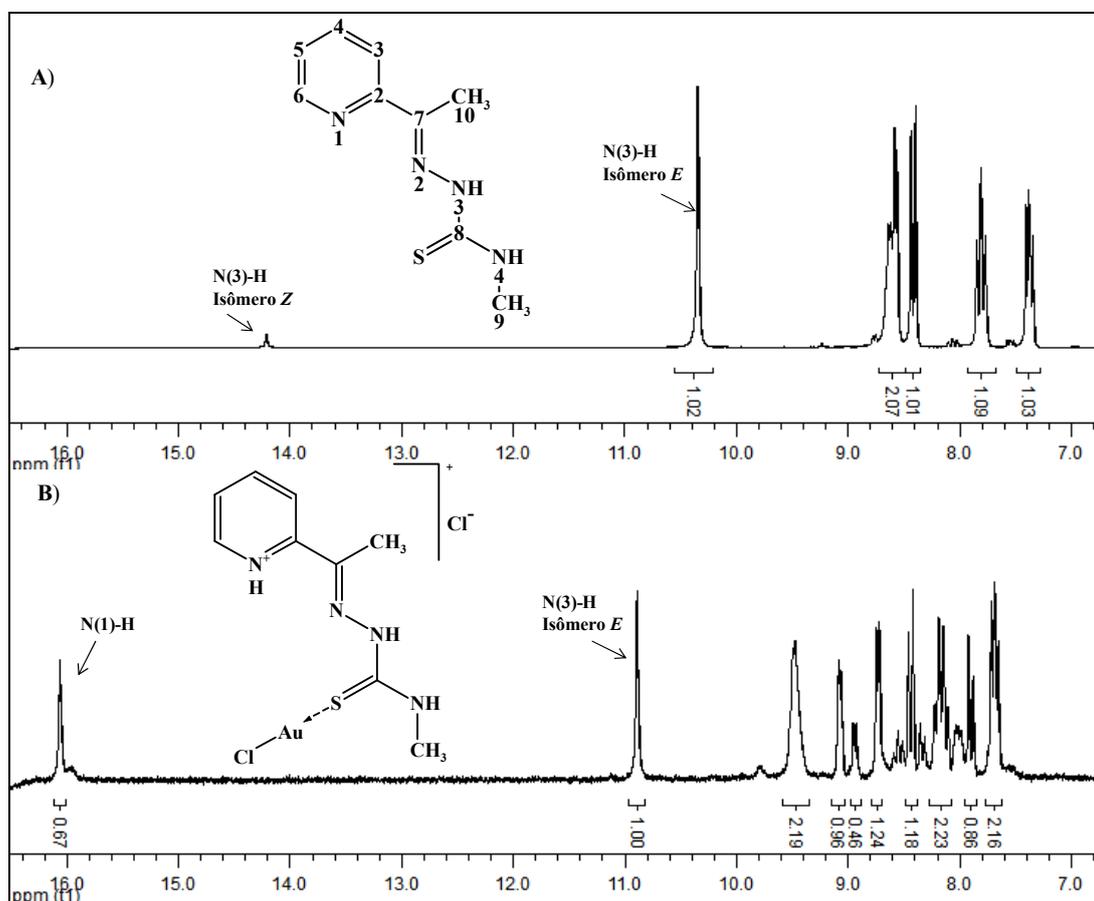


Figura 5.2.1.5. Espectros de RMN de ¹H na região entre 16,4 a 6,8 ppm: A) da tiossemicarbazona H2Ac4Me e B) do complexo (2) (DMSO-*d*₆).

Como alternativa para análise por RMN dos complexos, foram obtidos espectros dos compostos de RMN de ¹H em MeOD-*d*₄. Não foram obtidos espectros de RMN de ¹³C dos complexos (1-4) devido às suas baixas solubilidades em MeOD-*d*₄. As atribuições dos principais sinais de RMN de ¹H dos compostos se encontram na Tabela 5.2.1.3.

Os espectros de RMN de ¹H obtidos em MeOD-*d*₄ comprovam a pureza dos complexos e confirmam mudança dos deslocamentos dos sinais de hidrogênios das tiossemicarbazonas com a complexação. Nos espectros das tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina, o isômero *E* está presente como espécie majoritária (76 a 100%). No espectro de H2Bz4Ph os isômeros *E* e *Z* estão presentes na proporção 1:1. Nos espectros de 1-4 apenas uma forma isomérica das tiossemicarbazonas está presente. Porém, devido ao efeito de troca de prótons com o solvente, os sinais referentes a NH não aparecem em MeOD-*d*₄, de forma que não é

possível inferir qual seria esse isômero. A limitação de informações fornecidas pelos espectros dos compostos em MeOD- d_4 evidencia a importância da apresentação dos dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H em DMSO- d_6 , mencionados anteriormente. Como exemplos, são apresentados na Figura 5.2.1.6 os espectros de RMN de ^1H de H2Ac4Me e de **2** obtidos em MeOD- d_4 .

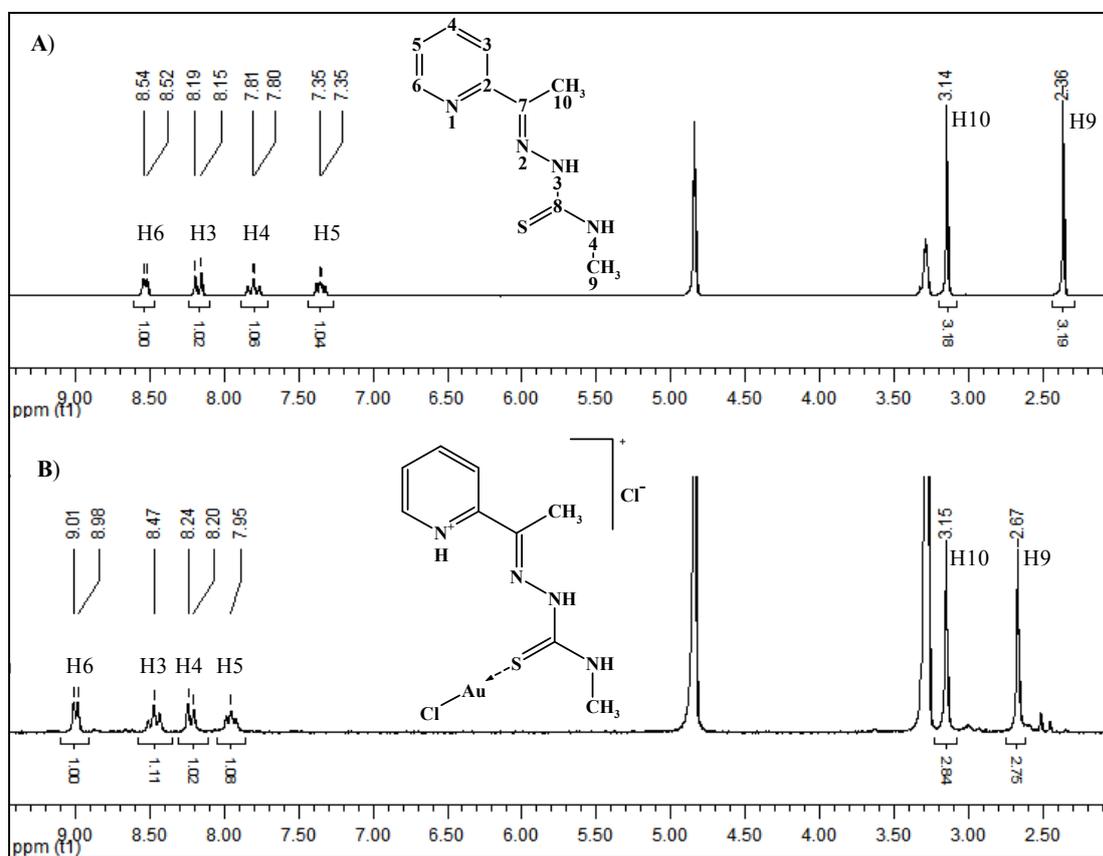


Figura 5.2.1.6. Espectros de RMN de ^1H : A) da tiossemicarbazona H2Ac4Me e B) do complexo [Au(H2Ac4Me)Cl]Cl (**2**) obtidos em MeOD- d_4 .

Tabela 5.2.1.3. Atribuição, multiplicidade (M)^a, número de hidrogênios (n^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas e dos complexos [Au(H₂Ac₄DH)Cl]·CH₃OH (**1**) [Au(H₂Ac₄Me)Cl]Cl (**2**), [Au(H₂Ac₄Ph)Cl]Cl·2H₂O (**3**) e [Au(H₂Bz₄Ph)Cl]Cl (**4**) (MeOD-*d*₄)

Atribuição	n ^o	M	H ₂ Ac ₄ DH (<i>E</i>)	1	M	H ₂ Ac ₄ Me (<i>E</i>)	2	M	H ₂ Ac ₄ Ph (<i>E</i>)	3	M	H ₂ Bz ₄ Ph (<i>E</i> , 50%)	H ₂ Bz ₄ Ph (<i>Z</i> , 50%)	4
H(6)	1	d	8,56	8,92	d	8,53	9,00	d	8,60	9,08	d	8,65	8,84	9,15
H(3)	1	d	8,17	8,46	d	8,17	8,22	d	8,20	8,34	m	7,75-7,50	7,75-7,50	7,76
H(4)	1	t	7,82	8,67	t	7,80	8,47	t	7,88	8,55	t	7,83	7,95	8,41
H(5)	1	t	7,38	8,07	t	7,35	7,96	t	7,38	8,04	m	7,28-7,12	7,28-7,12	8,02
H(9), H(10) ou (H15) ^b	1	s	2,40	2,57	s	2,36	2,67	s	2,47	2,79	-	-	-	-
H(9) ^c	3	s	-	-	s	3,14	3,15	s	-	-	-	-	-	-

^a s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, m = multiplete.

^b H(9), H(10) ou (H15) são os hidrogênios do grupo acetil de H₂Ac₄DH, H₂Ac₄Me, H₂Ac₄Ph e de seus complexos (**1-3**).

^c H(9) corresponde aos hidrogênios do substituinte metil no nitrogênio N(4) de H₂Ac₄Me e de seu complexo (**2**) (ver Figura 5.2.1.1).

5.2.2. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS

Monocristais dos complexos $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac4DH})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1a**) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz4Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**4**) foram obtidos do filtrado das sínteses de **1** e de **4**. Os dados cristalográficos de **1a** e **4** foram coletados no difratômetro Oxford-GEMINI, no modo $\theta-2\theta$, à temperatura ambiente (293 K). Os resumos da coleção de dados e do refinamento^{15,16,17} estão descritos na Tabela 5.2.2.1.

Nos complexos (**1a**) e (**4**), o íon metálico está coordenado ao enxofre da tiossemicarbazona e a um íon cloreto (Figura 5.2.2.1). A geometria em torno do íon metálico é quase linear (ângulo S-Au-Cl: $173,26(3)^\circ$), típica para compostos de ouro(I)^{29,30,31}. Dessa forma, os dados cristalográficos confirmam a redução de ouro(III) durante a síntese dos complexos.

Em ambos os complexos, a tiossemicarbazona está protonada no nitrogênio da piridina. Assim embora no complexo (**1**) a tiossemicarbazona se encontre na forma neutra no pó, em **1a**, o nitrogênio da piridina está protonado, assim como nos demais complexos (**2-4**), em consequência da exposição ao meio reacional acidificado pelo reagente HAuCl_4 .

Foi observado um aumento da ligação S(1)–C(8) de $1,681(3)$ Å em $[\text{H}_2\text{Ac4DH}]\text{Cl}$ (a tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac4DH}$ cristalizada na forma de cloridrato)³² para $1,712(5)$ Å em **1a** e de $1,663(2)$ Å em $\text{H}_2\text{Bz4Ph}$ ³³ para $1,701(3)$ Å em **4**, assim como uma diminuição da ligação N(3)–C(8) de $1,371(3)$ Å em $[\text{H}_2\text{Ac4DH}]\text{Cl}$ ³² para $1,345(6)$ Å em **1a** e de $1,360(2)$ Å em $\text{H}_2\text{Bz4Ph}$ para $1,345(3)$ Å em **4**, sugerindo que no caso dos complexos **1a** e **4**, o enxofre está coordenado ao ouro(I) na forma de tiona³⁴.

Comprimentos e ângulos de ligação selecionados para **1a** e **4** em comparação com $[\text{H}_2\text{Ac4DH}]\text{Cl}$ ³² e $\text{H}_2\text{Bz4Ph}$ ³³ são apresentados nas Tabelas 5.2.2.2 e 5.2.2.3.

Em **1a** e **4**, as tiossemicarbazonas adotam a conformação *EE* em relação às ligações C(7)=N(2) e N(3)–C(8). Essa conformação é a mesma observada em $[\text{H}_2\text{Ac4DH}]\text{Cl}$ ³². A tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Bz4Ph}$, por sua vez, apresenta a conformação *ZE*³³. Além disso, as ligações de hidrogênio N(1)H \cdots Cl e N(4)H \cdots Cl presentes em $[\text{H}_2\text{Ac4DH}]\text{Cl}$ também foram observadas para **1a** e **4**, sugerindo que essas interações favorecem a conformação *EE* nesses compostos (ver Tabela 5.2.2.4 e Figura 5.2.2.1). Essas ligações de hidrogênio também promovem a coplanaridade entre os planos do esqueleto da tiossemicarbazona e do anel da piridina.

Os complexos (**1a**) e (**4**) apresentam configuração *E* e *Z*, respectivamente, com relação à ligação C(8)=S. Essa diferença está relacionada à ligação de hidrogênio N(3) \cdots O em **1a**, a

³⁰ T.S. Lobana, S. Khanna, R.J. Butcher, Inorg. Chem. Commun. 11 (2008) 1433.

³¹ S.D. Khanye, N.B. Báthori, G.S. Smith, K. Chibale, Dalton Trans. 39 (2010) 2697.

³² S. Abram, U. Abram, Ulrich, Acta Crystallogr. C53 (1997) 360.

³³ A.P. Rebolledo, G.M. Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo, Appl. Organometal. Chem. 17 (2003) 945.

³⁴ P.J. Bonasia, D.E. Cindelberger, J. Arnold, Inorg. Chem. 32 (1993) 5126.

qual está ausente em **4**, e à presença do grupo substituinte volumoso *N*(4)-fenil em **4**, que causa impedimento estérico com o grupo Au(I)Cl(1) (ver Figura 5.2.2.1).

Um trabalho anterior relata a distância da ligação Au(I)–S de 2,319(1) Å para um complexo de ouro(I) contendo uma tiossemicarbazona e uma fosfina como ligantes²⁹. Em complexos de ouro(I) com duas tiossemicarbazonas como ligantes, as distâncias dessa ligação são de 2,2825(13) Å e 2,2818(13) Å³¹. Nos complexos (**1a**) e (**4**) as distâncias da ligação Au(I)–S são 2,2523(13) e 2,2539(8), respectivamente. Essas diferenças provavelmente podem ser atribuídas às ligações mais fortes entre o íon metálico e fosfina²⁹ ou enxofre³¹, nos complexos relatados anteriormente, em relação à ligação possivelmente mais fraca Au–Cl nos complexos (**1a**) e (**4**).

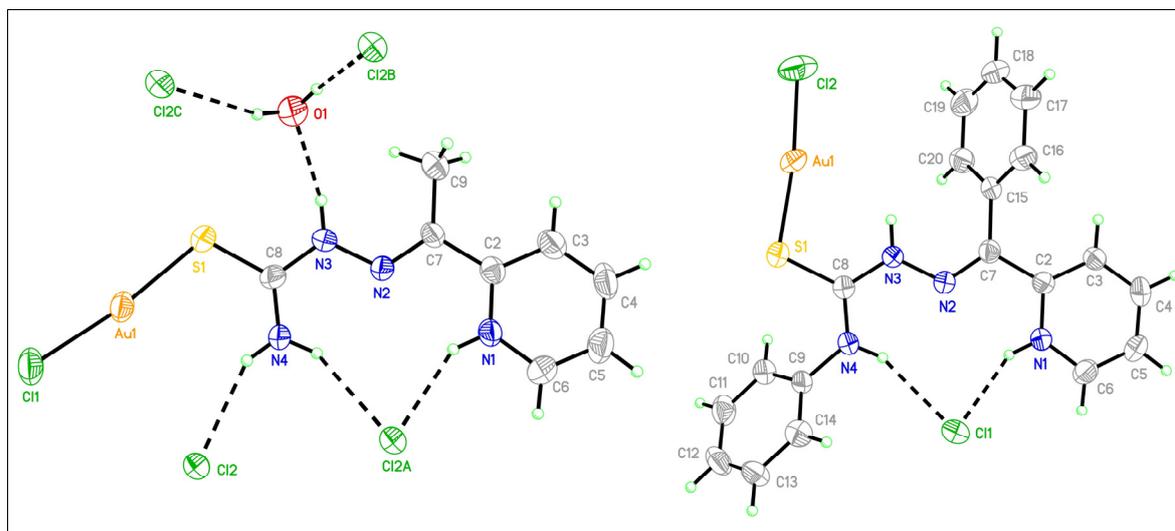


Figura 5.2.2.1. Estruturas de [Au(H₂Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**, esquerda) e [Au(H₂Bz4Ph)Cl]Cl (**4**, direita). As interações intermoleculares *via* ligação de hidrogênio estão pontilhadas. Em **1a**, os átomos Cl2A, Cl2B e Cl2C foram gerados por transformações de simetria.

Tabela 5.2.2.1. Resumo da coleção de dados cristalinos e de refinamento de [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**) e [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**)

Composto	1a	4	
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₃ AuCl ₂ N ₄ OS	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₄ SAu	
Massa molecular, g mol ⁻¹	481,15	601,29	
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	
Grupo de espaço	P 21/n	P 21/c	
Comprimento de onda, Å	0,71073	0,71073	
Dimensões da célula unitária	a, Å	8,2261(2)	13,2675(2)
	b, Å	15,5254(3)	6,8000(2)
	c, Å	10,7882(3)	22,9706(5)
	α, °	90	90
	β, °	96,523(2)	93,175(2)
	γ, °	90	90
Volume, Å ³	1368,88(6)	2069,20(8)	
Z / Densidade calc., Mg/m ³	4 / 2,335	4 / 1,930	
μ, mm ⁻¹	11,279	7,480	
F(000)	904	1152	
Dimensões do cristal, mm	0,38 x 0,12 x 0,06	0,24 x 0,16 x 0,10	
Intervalo de θ, °	2,81-29,52	3,08-29,51	
	-10 ≤ h ≤ 10	-18 ≤ h ≤ 16	
Intervalo de hkl	-19 ≤ k ≤ 19	-7 ≤ k ≤ 9	
	-13 ≤ l ≤ 13	-28 ≤ l ≤ 24	
Completeza, %	99,9 (26,37 °)	86,4 (29,51 °)	
S	0,986	0,887	
Reflexões medidas	16341	11961	
Reflexões únicas/R _{int}	2796/0,0881	4986/ 0,0214	
Parâm. Ref. / restrições	161/3	244/0	
R (obs/all)	0,0282/0,0354	0,0238/0,0412	
wR (obs/all)	0,0654/0,0668	0,0417/0,0434	
Δρ min/max (e Å ⁻³)	0,577/-0,969	0,631/-0,832	

Tabela 5.2.2.2. Comprimentos de ligação (Å) selecionados para [H₂2Ac4DH]Cl³², [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**), H₂Bz4Ph³³ e [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**)

Átomos	[H ₂ 2Ac4DH]Cl	1a	H2Bz4Ph	4
Au(1)–S(1)	-	2,2523(13)	-	2,2539(8)
Au(1)–Cl(1)	-	2,2700(13)	-	-
Au(1)–Cl(2)	-	-	-	2,2597(8)
S(1)–C(8)	1,681(3)	1,712(5)	1,663(2)	1,701(3)
N(1)–C(6)	1,335(3)	1,332(6)	1,335(3)	1,329(3)
N(1)–C(2)	1,352(3)	1,342(6)	1,343(2)	1,344(3)
N(2)–C(7)	1,293(3)	1,283(5)	1,296(2)	1,285(3)
N(2)–N(3)	1,358(3)	1,362(5)	1,362(2)	1,354(3)
N(3)–C(8)	1,371(3)	1,345(6)	1,360(2)	1,345(3)
N(4)–C(8)	1,308(4)	1,303(6)	1,343(3)	1,321(3)
N(4)–C(9)	-	-	1,410(2)	1,426(3)
C(2)–C(7)	1,480(3)	1,467(6)	1,484(3)	1,480(3)
C(7)–C(9)	1,488(4)	1,502(7)	-	-
C(7)–C(15)	-	-	1,492(3)	1,490(3)

Tabela 5.2.2.3. Ângulos de ligação (°) selecionados para [H₂2Ac4DH]Cl³², [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**), H₂Bz4Ph³³ e [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**)

Átomos	[H ₂ 2Ac4DH]Cl	1a	H2Bz4Ph	4
S(1)–Au(1)–Cl(1)	-	173,06(5)	-	-
S(1)–Au(1)–Cl(2)	-	-	-	173,27(3)
C(8)–S(1)–Au(1)	-	109,17(16)	-	107,70(10)
C(6)–N(1)–C(2)	122,7(3)	123,4(4)	118,3(2)	123,3(2)
C(7)–N(2)–N(3)	118,8(2)	119,6(4)	119,4(2)	118,3(2)
C(8)–N(3)–N(2)	119,8(2)	117,7(3)	120,5(2)	120,2(2)
N(1)–C(2)–C(3)	117,6(2)	117,5(4)	121,2(2)	118,0(2)
N(1)–C(2)–C(7)	117,8(2)	118,2(4)	118,1(2)	117,4(2)
C(3)–C(2)–C(7)	124,6(2)	124,3(4)	120,7(2)	124,6(2)
C(2)–C(3)–C(4)	120,4(3)	120,1(5)	119,0(2)	119,5(3)
C(5)–C(4)–C(3)	120,0(3)	119,4(5)	119,4(2)	120,3(3)
C(6)–C(5)–C(4)	118,5(3)	119,3(5)	118,6(2)	118,9(3)
N(1)–C(6)–C(5)	120,8(3)	120,2(5)	123,4(2)	120,0(3)
N(2)–C(7)–C(2)	114,4(2)	114,7(4)	127,5(2)	114,8(2)
N(4)–C(8)–N(3)	117,5(2)	119,6(4)	114,3(2)	118,3(2)
N(4)–C(8)–S(1)	124,7(2)	125,2(4)	128,0(1)	122,0(2)
N(3)–C(8)–S(1)	117,8(2)	115,1(3)	117,7(1)	119,8(2)

Tabela 5.2.2.4. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação de hidrogênio para [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**) e [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**)

Complexo	D–H···A ^a	d(D–H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
1a	N(1)–H(1)···Cl(2A) ⁱ	0,86	2,30	3,064(4)	148,7
	N(3)–H(3)···O(1)	0,86	2,03	2,842(5)	157,7
	N(4)–H(4A)···Cl(2A) ⁱ	0,86	2,49	3,277(4)	152,4
	N(4)–H(4B)···Cl(2)	0,86	2,47	3,247(4)	150,4
	O(1)–H(1B)···Cl(2B) ⁱⁱ	0,809(19)	2,53(3)	3,284(5)	155(5)
	O(1)–H(1A)···Cl(2C) ⁱⁱⁱ	0,814(19)	2,51(3)	3,268(4)	157(5)
4	N(1)–H(1)···Cl(1)	0,86	2,20	2,988(2)	151,9
	N(4)–H(4A)···Cl(1)	0,86	2,41	3,224(2)	157,1

^a Transformações de simetria: i = -x+2,-y+1,-z+1; ii = -x+1,-y+1,-z+1; iii = x-1,y,z.

5.2.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Foram estudados o potencial pró-apoptótico e a atividade dos complexos (**1-4**) contra as linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HCT-116 (carcinoma colorretal humano). Foi investigado o mecanismo de ação dos compostos através dos estudos de interação com ADN plasmidial e de inibição da atividade da enzima TrxR.

Atividade citotóxica

As células HL-60, MCF-7 e HCT-116 têm sido empregadas pelo Instituto Nacional de Câncer (NCI) dos Estados Unidos no estudo de triagem de compostos com potencial atividade antitumoral. Aproximadamente metade dos fármacos quimioterápicos atualmente utilizados por oncologistas para o tratamento de câncer foi descoberta ou desenvolvida no NCI utilizando esta estratégia³⁵. Células Jurkat são derivadas de células de linfócitos, as quais são usadas para determinar o mecanismo de susceptibilidade diferencial a fármacos anticâncer e à radiação. Além disso, células leucêmicas são usadas em programas de triagem como modelos preditivos para detectar novos compostos potencialmente antitumorais que induzem apoptose, uma vez que o mecanismo de apoptose nessas células está bem caracterizado^{36,37}.

Na Figura 5.2.3.1 são apresentadas as porcentagens de proliferação de células tumorais tratadas com as tiossemicarbazonas, seus complexos de ouro(I) (**1-4**) e HAuCl₄ *versus* controle (células tratadas com DMF, 0,1%). Os fármacos cisplatina e auranofina foram usados como controles positivos. O primeiro é um composto antitumoral, enquanto que o segundo é um fármaco empregado no tratamento de artrite reumatóide. A auranofina também foi utilizada como controle porque é um fármaco que contém ouro(I) em sua estrutura e há relatos de que

³⁵ R. H. Shoemaker, Nat. Rev. Cancer 6 (2006) 813.

³⁶ K. A. Tacka, J. C. Dabrowiak, J. Goodisman, H. S. Penefsky, A.K. Souid, Chem. Res. Toxicol. 17 (2004)1102.

³⁷ M. Monga, E. A. Sausville, Leukemia 16 (2002) 520.

este composto apresenta atividade citotóxica contra certas linhagens de células tumorais por indução de apoptose^{38,39}.

Uma vez que a piridina é uma base fraca, o próton do grupo piridínium (N_{py}-H) poderia ser facilmente liberado em solução. Assim, as formas ativas dos complexos (2-4) seriam preferencialmente espécies neutras.

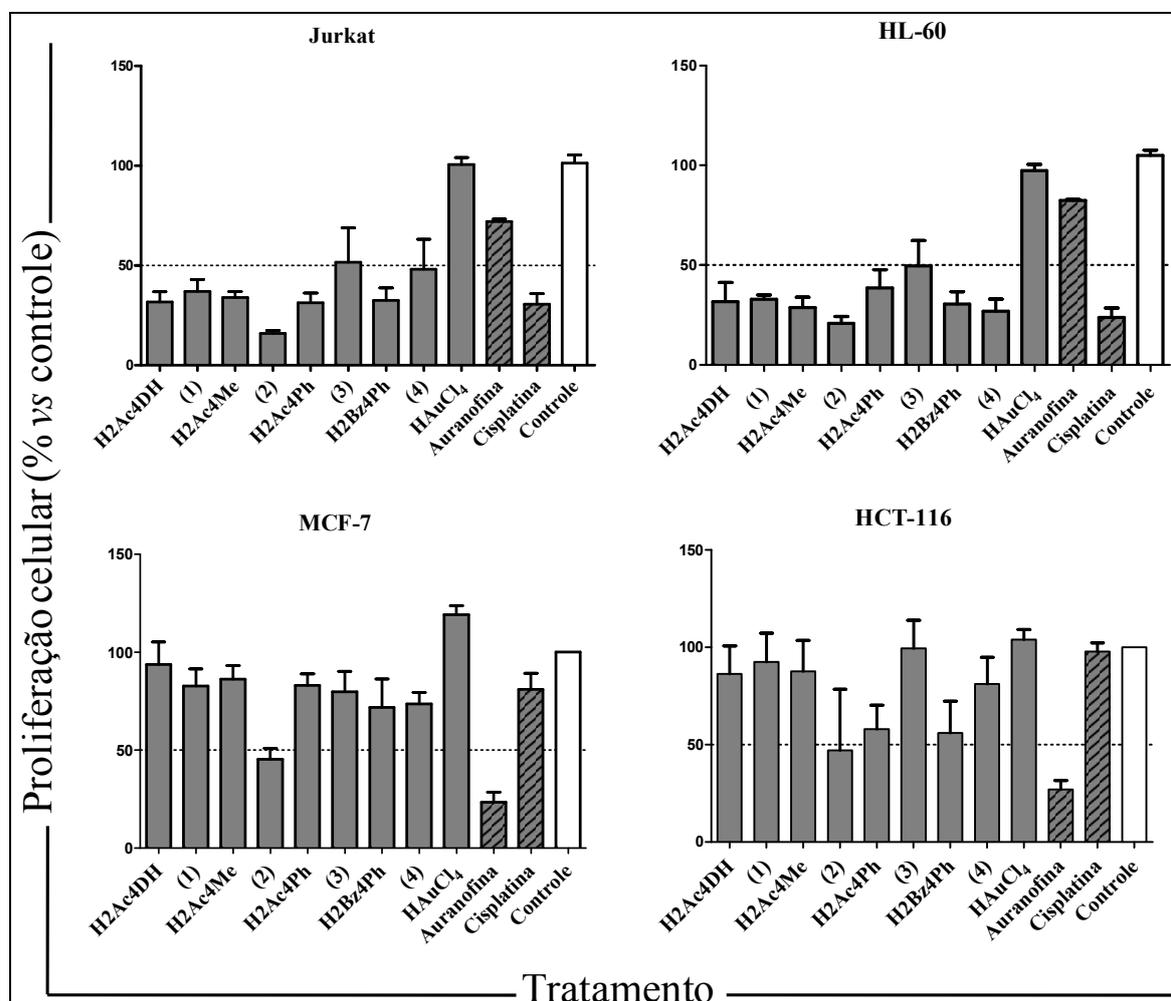


Figura 5.2.3.1. Efeito citotóxico de tiossemicarbazonas, seus complexos (1-4), auranofina e cisplatina contra linhagens de células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116. As células foram tratadas com os compostos (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média \pm erro padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMF, 0,1%) de três experimentos independentes realizados em triplicata.

De acordo com a Figura 5.2.3.1, em geral as tiossemicarbazonas e seus complexos (1-4) demonstraram efeitos citotóxicos contra as linhagens de células tumorais. As células leucêmicas Jurkat e HL-60 foram mais sensíveis aos compostos do que as células MCF-7 e HCT-116. Os compostos estudados foram mais citotóxicos contra células Jurkat e HL-60 do que auranofina, porém em geral foram menos ativas contra células MCF-7 e HCT-116 do que este fármaco. A maioria dos compostos apresentou citotoxicidade contra as linhagens

³⁸ A.G. Cox, K.K. Brown, E.S.J. Arner, M.B. Hampton, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1097.

³⁹ E.R.T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 225.

leucêmicas similar à cisplatina. O complexo (**2**) foi um dos compostos que apresentou maior citotoxicidade contra as quatro linhagens. A auranofina revelou-se menos citotóxica às células leucêmicas do que às linhagens de tumor sólido MCF-7 e HCT-116. Comportamento oposto foi observado para cisplatina. HAuCl_4 não apresentou efeito citotóxico contra todas as linhagens.

A concentração dos compostos que inibe em 50% o crescimento das células tumorais (CI_{50}) foi determinada para as tiossemicarbazonas e seus complexos (**1-4**) contra células Jurkat e HL-60 e apenas para o complexo (**2**) contra células MCF-7 e HCT-116. Com o intuito de avaliar a toxicidade dos compostos sobre células normais, também foi determinado seu valor de CI_{50} contra células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).

As células PBMC incluem os linfócitos e monócitos, que são células do sistema imunológico. O sistema imunológico pode ser alvo de fármacos com potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana. Esses compostos podem afetar, por exemplo, os linfócitos, que atuam sobre processos imunológicos envolvidos na homeostase do sistema imunológico e sobre processos patológicos⁴⁰. Sabe-se que os compostos antitumorais atuam não somente sobre as células cancerígenas, como também sobre células normais que mais se proliferam no organismo. Dessa forma, foi estimulada a proliferação de células PBMC com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA)⁴¹, com o objetivo de investigar a toxicidade sobre células humanas sadias que apresentam altas taxas de proliferação. Assim este ensaio foi utilizado como indicativo da citotoxicidade, bem como do potencial imunotóxico dos compostos. Os valores de CI_{50} para os compostos contra células tumorais e sadias se encontram na Tabela 5.2.3.1.

⁴⁰ F. F. Mahmoud, D. D. Haines, H. T. Abul, A. T. Abal, B. O. Onadeko, J. A. Wise. *J. Pharmacol. Sci.* 94 (2004) 129.

⁴¹ M. Carfi^o, A. Gennari, I. Malerba, E. Corsini, M. Pallardy, R. Pieters, H. Van Loveren, H. W. Vohr, T. Hartung, L. Gribaldo. *Toxicology* 229 (2007) 11.

Tabela 5.2.3.1. Atividade citotóxica (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra células Jurkat, HL-60, MCF-7, HCT-116 e PBMC de tiossemicarbazonas, seus complexos (1-4) e auranofina

Composto	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (Intervalo de confiança, 95%)				
	Jurkat	HL-60	MCF-7	HCT-116	PBMC
H2Ac4DH	3,502 (0,7896 a 15,53)	2,078 (0,6162 a 7,008)			4,683 (3,115 a 7,042)
1	50,58 (27,53 a 92,93)	8,615 (6,604 a 11,24)			3,527 (2,618 a 4,751)
H2Ac4Me	1,422 (0,9881 a 2,047)	0,9251 (0,8120 a 1,054)			0,01250 (0,002454 a 0,06364)
2	0,9319 (0,7563 a 1,148)	0,2022 (0,1114 a 0,3669)	1,65 (0,3278 a 8,303)	12,98 (7,236 a 23,27)	0,0002871 (0,00004219 a 0,001953)
H2Ac4Ph	1,675 (1,120 a 2,504)	0,07934 (0,03313 a 0,1900)			0,08250 (0,03369 a 0,2021)
3	208,4 (56,19 a 773,2)	3,654 (2,036 a 6,560)			0,5222 (0,2494 a 1,093)
H2Bz4Ph	22,99 (19,21 a 25,45)	3,623 (0,9090 a 14,44)			0,7047 (0,3626 a 1,370)
4	6,855 (5,057 a 9,294)	1,162 (0,5439 a 2,481)			2,041 (0,4915 a 8,475)
auranofina	2,373 (1,323 a 4,258)	1,417 (0,6865 a 2,924)	1,505 (0,5727 a 3,953)	2,674 (1,959 a 3,650)	0,04726 (0,01322 a 0,1690)

De acordo com a Tabela 5.2.3.1, os compostos foram mais citotóxicos contra células HL-60 do que contra células Jurkat. H2Ac4Me e H2Ac4Ph foram mais citotóxicos do que auranofina contra ambas as linhagens leucêmicas. Foi observado aumento da atividade com a coordenação para os complexos (2) e (4) contra células HL-60 e Jurkat. O complexo (2), por exemplo, foi cerca de quatro vezes mais citotóxico contra células HL-60 do que a tiossemicarbazona H2Ac4Me. Além disso, 2 foi o complexo mais ativo contra ambas as células leucêmicas, sendo o único complexo mais ativo que auranofina contra as mesmas linhagens.

Os complexos (2) e (4) também foram mais citotóxicos contra células HL-60 do que auranofina. 2 foi tão ativo quanto auranofina contra células MCF-7, porém menos ativo do que esse composto controle contra células HCT-116.

A auranofina foi mais tóxica às células PBMC do que às células tumorais. A maioria dos compostos estudados foi menos tóxica às células PBMC do que o fármaco controle, com exceção de H2Ac4Me e do complexo (2). A toxicidade diminuiu com a coordenação para os complexos (3) e (4). H2Ac4DH e o complexo (4) foram os compostos que exibiram menor toxicidade às células PBMC do que às células HL-60, apresentando assim os melhores índices terapêuticos.

Com o objetivo de investigar a relação entre inibição da proliferação celular e indução de apoptose pelos compostos, foi determinado o conteúdo de ADN sub-diplóide nas quatro linhagens tumorais. O conteúdo de ADN sub-diplóide foi determinado para a quantificação da fragmentação do ADN celular, a qual é uma das características de morte celular por apoptose. Este ensaio foi utilizado como método preditivo do potencial pró-apoptótico dos compostos. O resultado se encontra na Figura 5.2.3.2.

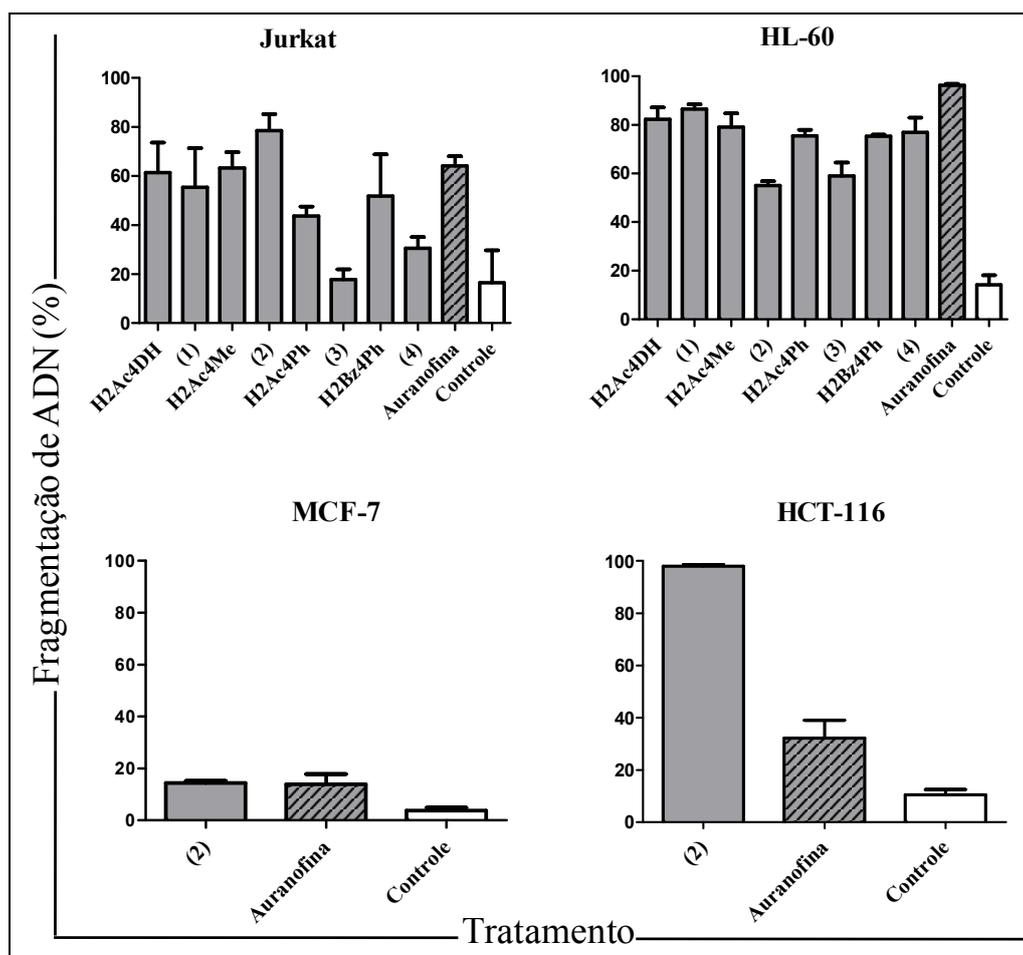


Figura 5.2.3.2. Porcentagem de fragmentação de ADN em células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116 induzida por tiossemicarbazonas, complexos (1-4), auranofina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e DMF 0,1% (controle). Os dados são expressos como média \pm erro padrão de porcentagem de fragmentação de ADN.

Na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, todos os compostos induziram mais de 50% de fragmentação do ADN em células HL-60. O complexo (2) foi o composto que menos induziu a fragmentação do ADN, embora seja o composto mais citotóxico. Fragmentação de ADN com a indução de apoptose parece ser um mecanismo de ação dos compostos contra células HL-60.

A capacidade dos compostos em induzir a fragmentação de ADN está de acordo com as atividades citotóxicas dos compostos contra células Jurkat, ou seja, em geral compostos mais ativos promoveram maior fragmentação de ADN, sugerindo que a apoptose pode estar envolvida no mecanismo de ação desses compostos.

A porcentagem de fragmentação de ADN foi determinada apenas para o complexo (2) e para auranofina em células MCF-7 e HCT-116. Ambos apresentaram efeitos citotóxicos contra células MCF-7, entretanto induziram apenas cerca de 20 % de fragmentação de ADN. Assim, fragmentação de ADN provavelmente não é o principal mecanismo de ação desses compostos.

O complexo (2) promoveu 100 % de fragmentação do ADN de células HCT-116, enquanto que auranofina promoveu apenas 35 % da fragmentação. Entretanto, a auranofina foi

significativamente mais ativa do que **2** contra essa linhagem. Os resultados sugerem que a fragmentação de ADN é o principal modo de ação do complexo (**2**) mas não da auranofina contra células HCT-116.

Estudos de interação com ADN plasmidial

Uma vez que em geral **2** foi o complexo mais citotóxico, foi realizado um estudo de sua interação com o ADN como forma de avaliação de um possível alvo biológico para sua citotoxicidade. O efeito do complexo (**2**) sobre a conformação do ADN foi avaliado por mobilidade eletroforética do plasmídeo pGEM-T após tratamento com o complexo. Na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, o complexo (**2**), assim como $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me}$, HAuCl_4 e auranofina não alteraram significativamente a mobilidade eletroforética do ADN (ver Figura 5.2.3.3). Também não foi observada clivagem do ADN na presença dos compostos estudados.

Assim, os estudos revelaram que os compostos não interagem diretamente com o ADN a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou, se interagem, não formam adutos estáveis. Além disso, os compostos não promovem clivagem do ADN. Portanto, a fragmentação de ADN observada nas células tumorais possivelmente é resultado de morte celular por apoptose e não da interação direta desses compostos com o ADN.

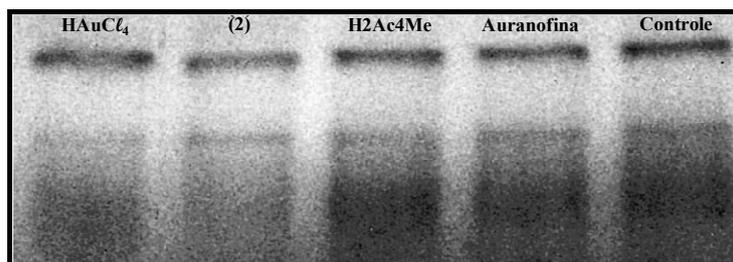


Figura 5.2.3.3. Mobilidade eletroforética em gel de agarose (1 %) de ADN plasmidial pGEM®-T incubado com DMF 2,5 % (controle), $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me}$, **2** ou HAuCl_4 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) a 37°C em tampão Tris-HCl ($\text{NaCl } 50 \text{ mmol L}^{-1}$, Tris-HCl 5 mmol L^{-1} , pH 7,2) por 24h.

Inibição da atividade enzimática de tiorredoxina redutase (TrxR)

A inibição de TrxR foi considerada outro potencial mecanismo para a atividade anti-proliferativa dos complexos (**1-4**). Assim, foram investigadas as atividades inibitórias *in vitro* de TrxR promovida por **2**, $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me}$, HAuCl_4 e auranofina, pelo ensaio de redução de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB). **2** inibiu a atividade enzimática, sendo que a concentração necessária para inibir em 50% a atividade da enzima (CI_{50}) foi igual a $2,476 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Intervalo de confiança 95% = $2,076$ a $2,953 \mu\text{mol L}^{-1}$) (ver Figura 5.2.3.4), sugerindo que TrxR é um possível alvo biológico para a ação citotóxica do complexo.

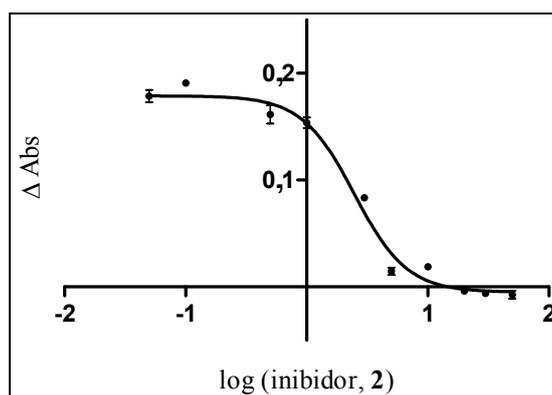


Figura 5.2.3.4. Efeito inibitório do complexo (2) sobre a atividade de TrxR. A curva log (inibidor, 2) vs resposta (absorbância) foi obtida para determinação de CI_{50} . TrxR foi tratada por 1 h a 37 °C com o complexo (2) em dez diferentes concentrações na faixa de 0,05 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a atividade da enzima foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Representação de dados de experimentos realizados em triplicata.

A capacidade do complexo (2) de inibir a atividade de TrxR foi comparada com as de H2Ac4Me, HAuCl₄ e auranofina nas concentrações 0,5, 5,0 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 5.2.3.5), sendo a última concentração a mesma utilizada nos ensaios da atividade antiproliferativa dos compostos (ver Figura 5.2.3.1).

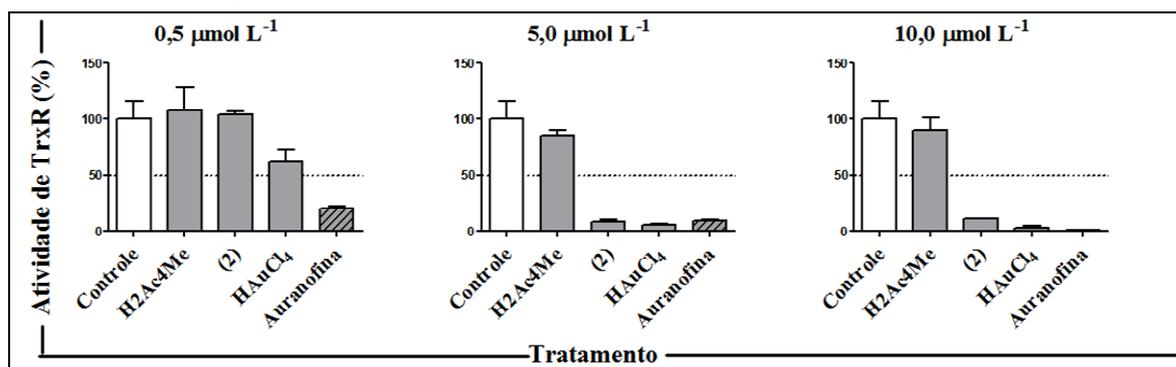


Figura 5.2.3.5. Efeito inibitório H2Ac4Me, 2, HAuCl₄ e auranofina sobre a atividade de TrxR. A enzima foi incubada com DMF 2,5% (controle) e com os compostos nas concentrações 0,5, 5,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h a 37 °C. A atividade de TrxR foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da atividade de TrxR.

Em 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, H2Ac4Me e 2 não inibiram a atividade enzimática, enquanto que HAuCl₄ e auranofina promoverem sua inibição em 38,2 % e 78,9 %, respectivamente. A 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as porcentagens médias de inibição de TrxR foram: 91,5 % (2), 94,4 % (HAuCl₄) e 90,6 % (auranofina). Em 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2 inibiu em 89,1% a atividade de TrxR, enquanto que HAuCl₄ e auranofina promoverem inibição de 97,3 % e 98,9%, respectivamente. H2Ac4Me promoveu baixa inibição de TrxR (< 15 %) nas três concentrações utilizadas.

Uma vez que não apenas o complexo de ouro (2) e a auranofina, como também HAuCl₄ revelaram-se fortes inibidores da atividade enzimática, o efeito inibitório de TrxR está relacionado à presença do íon metálico. No entanto, embora HAuCl₄ iniba a atividade de TrxR, composto não exibiu atividade citotóxica contra as linhagens HL-60, Jurkat, MCF-7 e HCT-

116. O caráter hidrofílico de HAuCl_4 provavelmente impede sua passagem pela membrana celular. Diferente de HAuCl_4 , o complexo (2) não apenas inibiu a atividade de TrxR, como também apresentou efeito citotóxico, sugerindo que a tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me}$, além de seu efeito citotóxico intrínseco, também atuou como carreador de íon ouro para o interior das células. É possível que o efeito citotóxico do complexo (2) possa ser mediado por ambos o ouro e a tiossemicarbazona, através da dissociação do complexo, conforme sugerido por outros autores^{42,43}. Assim, o complexo (2) poderia conter duas entidades as quais atuariam sobre diferentes alvos em um mesmo composto: a tiossemicarbazona, cujo alvo biológico é a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) e o íon ouro(I), o qual atuaria sobre a TrxR.

A indução de apoptose por auranofina em células Jurkat pareceria ser mediada pela inibição de TrxR mitocondrial e citosólica, sendo acompanhada por aumento do nível de peróxido de hidrogênio⁶. A capacidade do complexo (2) de atuar como inibidor de TrxR sugere que esta enzima mitocondrial é seu potencial alvo celular e assim o distúrbio da função mitocondrial poderia ser um potencial mecanismo de morte celular. Desse modo, embora possivelmente o complexo (2) não interaja diretamente com o ADN nem promova sua clivagem, a fragmentação de ADN nas células tumorais Jurkat, HL-60 e HCT-116 foi resultado, pelo menos em parte, da capacidade do complexo de inibir a TrxR. A inibição dessa enzima pode desencadear o mau funcionamento da função mitocondrial eventualmente levando à morte por apoptose. Da mesma forma, a fragmentação de ADN observada na presença de auranofina poderia ser atribuída à sua capacidade em inibir a enzima TrxR.

Uma vez que foi observada apenas fragmentação de 20 % do ADN em células MCF-7 na presença do complexo (2), nesse caso provavelmente a enzima TrxR não é o principal alvo para a ação citotóxica desse complexo.

Como os complexos (1-4) apresentaram um perfil pró-apoptótico, estes poderiam ser considerados potenciais “agentes antimitocondriais”, assim como outros complexos de ouro^{Erro! Indicador não definido.}. Vale salientar que outros estudos devem ser realizados para comprovar esta proposição. Esses estudos compreenderiam a investigação (a) dos efeitos do complexo sobre o potencial e a permeabilidade da membrana mitocondrial, (b) do acúmulo de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria e (c) da expressão de proteínas associadas com a inibição da função mitocondrial.

⁴² A.N. Wein, A.T. Stockhausen, K.I. Hardcastle, M.R. Saadein, S. Peng, D. Wang, D.M. Shin, Z. Chen, J.F. Eichler, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 663.

⁴³ L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O’Connell, P. Zanello, J. Med. Chem. 43 (2000) 3541.

Capítulo 6.

Complexos de bismuto(III), ouro(I) e ouro(III) com glioxaldeído bis(tiossemicarbazonas): atividade antimicrobiana e citotoxicidade contra células tumorais

Bis(tiossemicarbazonas) são agentes quelantes que possuem propriedades biológicas importantes, entre as quais atividade citotóxica contra células tumorais¹ e atividade antimicrobiana². Devido a essas propriedades, houve grande interesse em complexar essas moléculas a metais, como bismuto, cobre, zinco e níquel^{3,4,5}.

A atividade antibacteriana de bismuto é conhecida. Compostos de bismuto têm sido usados no tratamento de doenças do trato gastrointestinal e de infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*⁶. A coordenação de bismuto a *bis*(tiossemicarbazonas) poderia, em princípio levar à formação de complexos com interessante perfil antimicrobiano já que reuniriam as propriedades dos ligantes às do metal em um único composto.

O ouro é utilizado na clínica principalmente no tratamento de artrite reumatóide. Entretanto, compostos de ouro(I) e ouro(III) também vêm despertando atenção por sua capacidade de inibir fortemente o crescimento de células tumorais, através da inibição da tiorredoxina redutase (TrxR), enzima envolvida na biossíntese do ADN⁷. Assim, a busca de novos metalofármacos à base de ouro com *bis*(tiossemicarbazonas) seria interessante, em função da atividade citotóxica de ambos, ligante e metal, contra células tumorais. O complexo teriam assim o metal e a *bis*(tiossemicarbazona) com propriedades antitumorais reunidos em um único composto e agindo por meio de mecanismos diferentes. De fato, o modo de ação das *bis*(tiossemicarbazonas) pareceria envolver a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) e aquele do ouro está relacionado à inibição de TrxR. A literatura reporta complexos de ouro que apresentam atividade inibitória sobre TrxR, demonstrando a relevância desta enzima na farmacologia de compostos que contêm este metal. A superexpressão de TrxR tem sido observada em várias linhagens de células tumorais. Além disso, elevados níveis do substrato tiorredoxina tem sido associado à resistência à cisplatina. Portanto, TrxR é um alvo interessante a ser considerado para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer⁸.

Neste capítulo são apresentadas a caracterização e atividade biológica de complexos de bismuto(III), ouro(I) e ouro(III) com *bis*(tiossemicarbazonas) derivadas de glioxaldeído. Foi investigada a atividade de complexos de bismuto(III) contra as bactérias *gram*-positivas. A citotoxicidade dos complexos de ouro(I) e ouro(III) foi avaliada contra células leucêmicas e de

¹ A. Diaz, I. Garcia, R. Cao, H. Beraldo, M. M. Salberg, D. X. West, L. González, E. Ochoa. Polyhedron 16 (1997) 3549.

² S. Chandra, S. Raizada, M. Tyagi, A. Gautam, Bioinorg. Chem. Appl. (2007) 1.

³ D. X. West, J. S. Ives, G. A. Bain, A. E. Liberta, J. Valdés-Martínez, K. H. Ebert, S. Hernández-Ortega. Polyhedron 16 (1997) 1895.

⁴ H. Beraldo, S. B. Kaisner, J. D. Turner, I. S. Billeh, J. S. Ives, D. X. West. Transition Met. Chem. 22 (1997) 459.

⁵ H. Beraldo, L. P. Boyd, D. X. West. Transition Met. Chem. 23 (1998) 67.

⁶ G. G. Briand, N. Burford, Chem. Rev. 99 (1999) 2601.

⁷ A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1692.

⁸ A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1692.

carcinomas de mama e colorretal. O mecanismo de ação citotóxica dos complexos de ouro foi investigado através de estudos de inibição da atividade enzimática de TrxR.

6.1. Complexos de bismuto(III) com glicoxaldeído bis(tiossemicarbazona) (H_2Gy3DH) e seus derivados $N(3)$ -etil (H_2Gy3Et) e $N(3)$ -fenil (H_2Gy3Ph) substituídos

6.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE BISMUTO(III)

Foram sintetizados três complexos de bismuto(III) com glicoxaldeído bis(tiossemicarbazona) (H_2Gy3DH) e seus derivados $N(3)$ -etil- (H_2Gy3Et) e $N(3)$ -fenil- (H_2Gy3Ph) substituídos (Figura 6.1.1.1): $[Bi(H_2Gy3DH)Cl_3]$ (**1**), $[Bi(H_2Gy3Et)(OH)_2Cl]$ (**2**) e $[Bi(H_2Gy3Ph)Cl_3]$ (**3**) (Figura 6.1.1.2). Os produtos foram caracterizados por seus pontos de fusão, análise elementar, dosagem de bismuto por absorção atômica, medidas de condutividade molar e por seus espectros eletrônicos, de infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

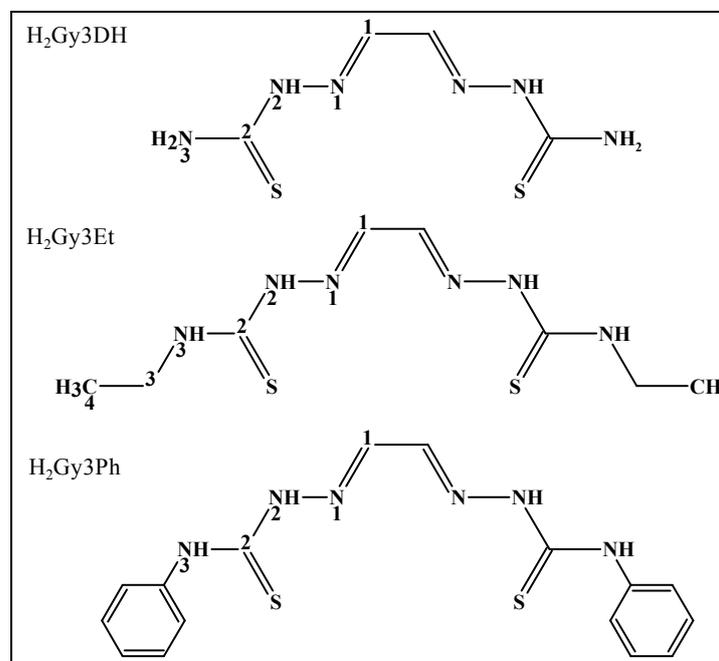


Figura 6.1.1.1. Estruturas das bis(tiossemicarbazonas) H_2Gy3DH , H_2Gy3Et e H_2Gy3Ph , utilizadas nas sínteses dos complexos (**1-3**), e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

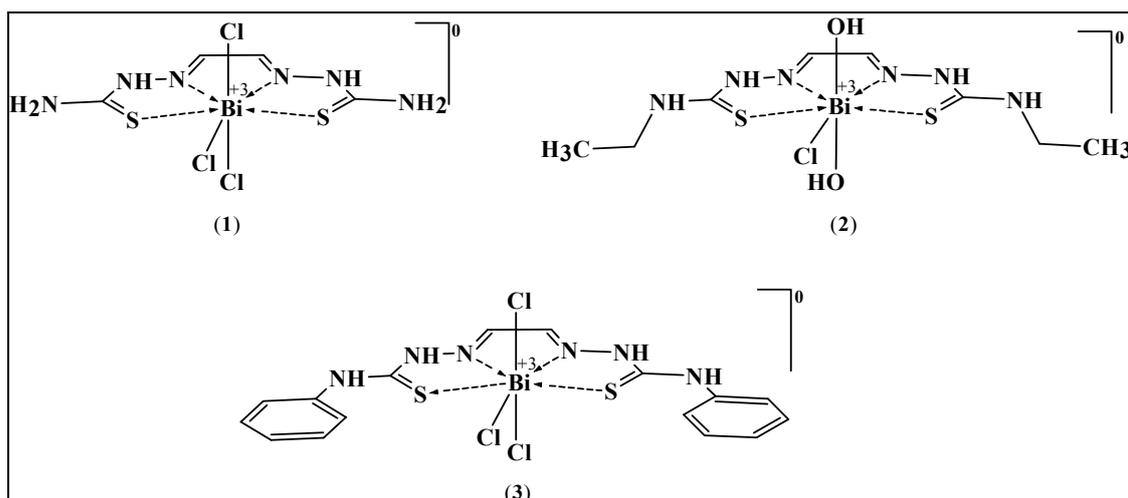


Figura 6.1.1.2. Estruturas propostas para os complexos $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (3).

Microanálises, condutividade molar e absorção atômica

Os resultados das análises sugerem a formação de compostos do tipo $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}_3]$ para os complexos (1) e (3) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{L})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ para o complexo (2), nos quais as bis(tiossemicarbazonas) estão coordenadas ao íon bismuto(III) em sua forma neutra (H_2L) (ver Figura 6.1.1.2). As análises condutimétricas ($\text{DMF} \sim 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) indicam que os complexos não são eletrólitos⁹, ou seja, os cloretos estariam coordenados ao íon metálico. Os valores absolutos de % Bi experimental e teórico diferem em até 3,5%, provavelmente em consequência de problemas com abertura das amostras durante a análise. Entretanto, esses valores permitiram confirmar a presença do íon metálico nas estruturas de 1-3. Os rendimentos das reações, massas molares, resultados de microanálises, valores de % de bismuto determinados por absorção atômica e condutividades molares dos complexos 1-3 são apresentados na Tabela 6.1.1.1.

Tabela 6.1.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão^a, análise elementar^b, % de bismuto, massa molar (MM), condutividade molar ($\text{DMF}, 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) dos complexos $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (3)

Composto	R (%)	Ponto de fusão (°C)	% C	% H	% N	% Bi ^c	Fórmula mínima e MM (g mol ⁻¹)	Λ_M ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
1	78,8	224,6 (ND) ^d	10,05 (9,25)	1,51 (1,55)	16,31 (16,17)	43,50 (40,22)	$\text{C}_4\text{H}_8\text{BiCl}_3\text{N}_6\text{S}_2$ 519,62	8,04
2	82,6	218,7-219,6 (251,2-251,4)	18,08 (17,83)	3,20 (3,37)	15,58 (15,60)	38,48 (38,78)	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{BiClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ 538,83	5,93
3	89,6	255,0-256,2 (ND) ^d	28,39 (28,61)	2,28 (2,40)	12,29 (12,51)	28,49 (31,11)	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{BiCl}_3\text{N}_6\text{S}_2$ 671,81	20,86

^a Pontos de fusão das tiossemicarbazonas livres se encontram entre parêntesis.

^b Valores teóricos se encontram entre parêntesis.

^c A porcentagem de bismuto foi determinada por absorção atômica.

^d ND = Não determinado. Até 280 °C o composto não fundiu.

⁹ W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.

Espectros de Infravermelho

O estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, em $1596\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de infravermelho das *bis*(tiossemicarbazonas) livres desloca-se com a complexação para maiores energias ($1616\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$), sugerindo que ocorre a coordenação pelo nitrogênio imínico.

As absorções referentes a $\nu(\text{C}=\text{S})$ observadas em $836\text{-}771\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das *bis*(tiossemicarbazonas) livres deslocam-se para $834\text{-}761\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de **1-3**. O pequeno deslocamento sugere a coordenação pelo enxofre na forma de tiona¹⁰.

Para os complexos (**1-3**) verifica-se a permanência de todas as bandas atribuídas às vibrações de N-H, sugerindo que as *bis*(tiossemicarbazonas) encontram-se coordenadas ao centro metálico em sua forma neutra.

No espectro de **2** foi observada uma banda em 3278 cm^{-1} , a qual foi atribuída a $\nu(\text{O-H})$. Novas bandas observadas em $331\text{-}285$, $273\text{-}248$ e $237\text{-}188\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de infravermelho de **1-3** foram atribuídas às vibrações $\nu(\text{Bi-N})$ ¹¹, $\nu(\text{Bi-S})$ ¹² e $\nu(\text{Bi-Cl})$ ¹¹ respectivamente. A banda adicional presente no espectro de **2** em 440 cm^{-1} foi atribuída a $\nu(\text{Bi-O})$ ^{13,14} (ver Figura 6.1.1.3).

A coordenação de *bis*(tiossemicarbazonas) em sua forma neutra a bismuto(III) produziu pequenas variações nas bandas nos espectros de infravermelho de **1-3**. Entretanto, a presença de bandas adicionais nos espectros de **1-3** na região de $710\text{-}180\text{ cm}^{-1}$ sugere a complexação de bismuto(III) ao sistema quelante $\text{N}_2\text{-S}_2$ das *bis*(tiossemicarbazonas). Na Tabela 6.1.1.2 são apresentadas as principais bandas observadas nos espectros de infravermelho das *bis*(tiossemicarbazonas) e dos complexos (**1-3**).

¹⁰ A. Castiñeiras, R. Pedrido, G. Pérez-Alonso, Eur. J. Inorg. Chem. (2008) 5106.

¹¹ G. Davidson, Spectroscopic Properties of Inorganic and Organometallic Compounds (37), The Royal Society of Chemistry, 2005.

¹² H. P. S. Chauhan, N. M. Shaik, U. P. Singh, Appl. Organometal. Chem. 20 (2006) 142.

¹³ Xiao Li and Andrew A. Gewirth, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 7086.

¹⁴ R. P. Oertel, R. A. Plane, Inorg. Chem. 7 (1968) 1192.

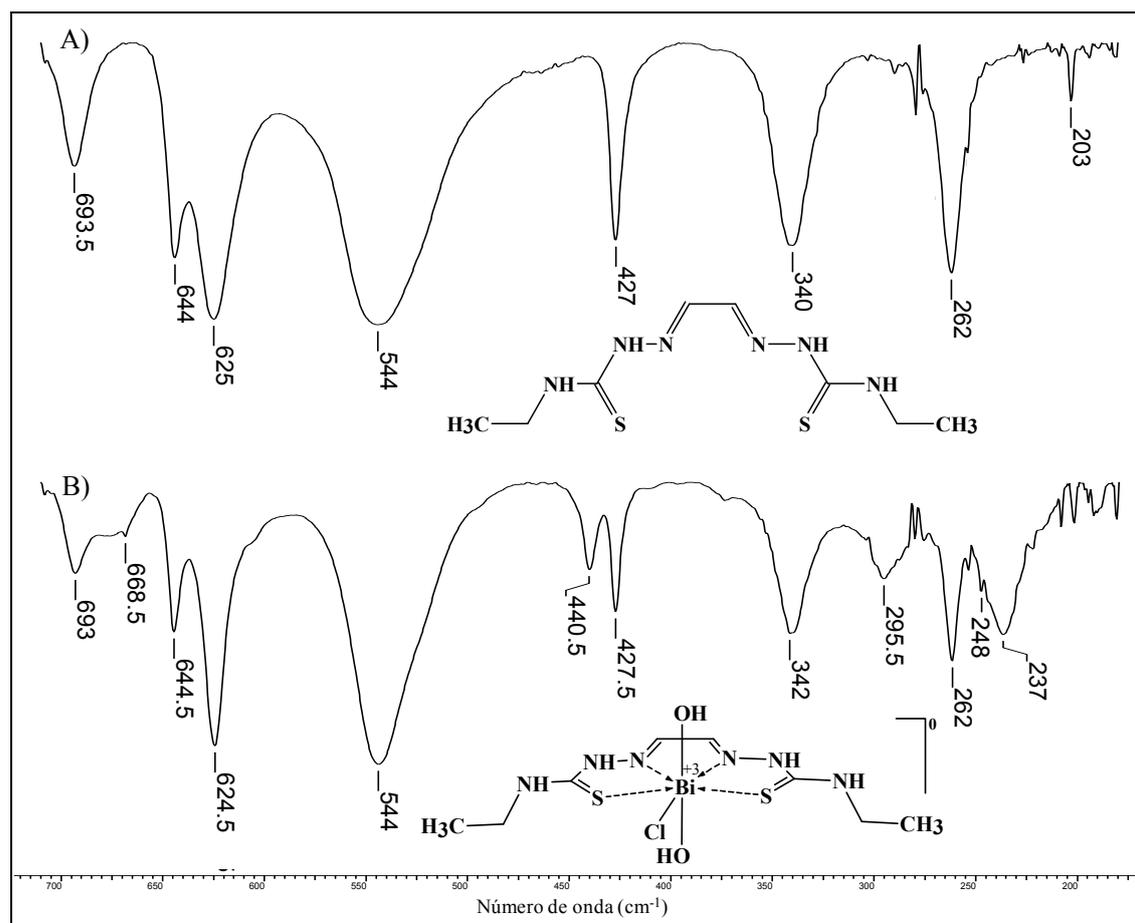


Figura 6.1.1.3. Espectros de infravermelho A) de H_2Gy3Et e B) de $Bi(H_2Gy3Et)(OH)_2Cl$ (**2**), obtidos em $nujol/CsI$, na região de $710-180\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 6.1.1.2. Bandas selecionadas^a nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das *bis*(tiossemicarbazonas) livres e de seus complexos $[Bi(H_2Gy3DH)Cl_3]$ (**1**), $[Bi(H_2Gy3Et)(OH)_2Cl]$ (**2**) e $[Bi(H_2Gy3Ph)Cl_3]$ (**3**)

Composto	$\nu(N-H)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C=S)$	$\nu(Bi-N)$	$\nu(Bi-S)$	$\nu(Bi-Cl)$	$\nu(Bi-O)$
H_2Gy3DH	3387m, 3247m, 3164m	1583F	836m	-	-	-	-
1	3369m, 3258m, 3174m	1595F	834m	331	271	204	-
H_2Gy3Et	3371m, 3133m	1570F	808m	-	-	-	-
2	3370m, 3154m	1616F	750m	296	248	237	441
H_2Gy3Ph	3298m, 3152m	1596F	771f	-	-	-	-
3	3297m, 3158m	1602F	761f	285	273	188	-

^a As intensidades das bandas estão assinaladas como: F (forte), m (média) ou f (fraca).

Espectros de ressonância magnética nuclear

Os complexos $[Bi(H_2Gy3DH)Cl_3]$ (**1**), $[Bi(H_2Gy3Et)(OH)_2Cl]$ (**2**) e $[Bi(H_2Gy3Ph)Cl_3]$ (**3**) foram caracterizados por RMN de 1H , ^{13}C e DEPT em $DMSO-d_6$. Nos espectros de RMN 1H de **1-3** foram observados os sinais referentes a todos os hidrogênios dos ligantes, indicando que as *bis*(tiossemicarbazonas) estão coordenadas ao bismuto(III) na forma neutra. Estes sinais, por sua vez, permanecem praticamente inalterados nos espectros de RMN de 1H

de **1-3**. Porém, a porcentagem de bismuto determinada por absorção atômica confirma a presença do metal nas estruturas dos complexos. Possivelmente a coordenação não afeta os deslocamentos químicos das *bis*(tiossemicarbazonas) ou estaria ocorrendo a descomplexação em DMSO- d_6 . Para averiguar tal hipótese, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H de apenas um dos complexos (complexo **3**) em DMF- d_7 e acetona- d_6 , uma vez que estes solventes apresentam similar ou menor potencial coordenante do que DMSO- d_6 .

Nas Figuras 6.1.1.4 - 6.1.1.6 são apresentados os espectros de RMN de ^1H de $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$ e do complexo (**3**) em DMSO- d_6 , DMF- d_7 e acetona- d_6 , respectivamente. Os sinais da *bis*(tiossemicarbazona) sofrem mudanças pouco significativas, independentemente do tipo de solvente utilizado. Assim, provavelmente em **3**, bem como nos demais complexos, a coordenação a bismuto(III) não afeta os deslocamentos químicos das *bis*(tiossemicarbazonas) e não estaria ocorrendo descomplexação nos solventes utilizados. A coordenação do ligante neutro não acarreta grandes variações de densidade eletrônica, o que poderia se refletir na semelhança entre os espectros das *bis*(tiossemicarbazonas) e os de seus complexos de bismuto(III).

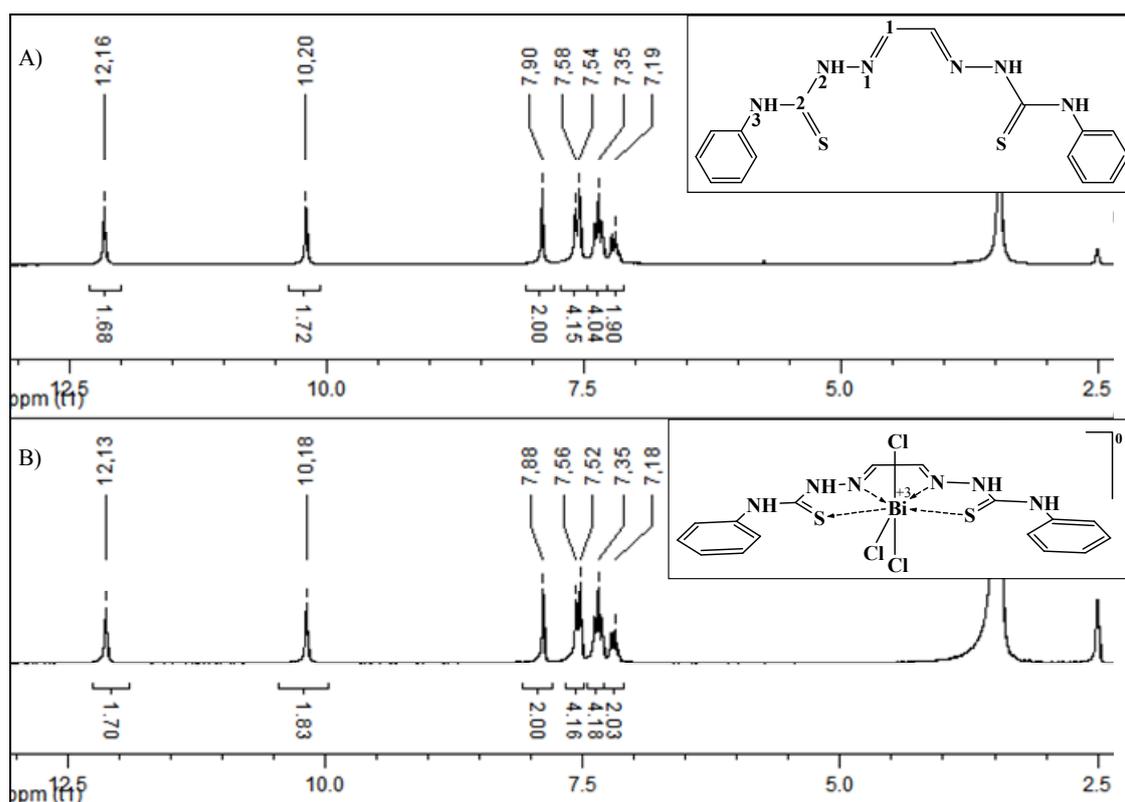


Figura 6.1.1.4. Espectros de RMN ^1H A) de $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$ e B) de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (**3**) em DMSO- d_6 .

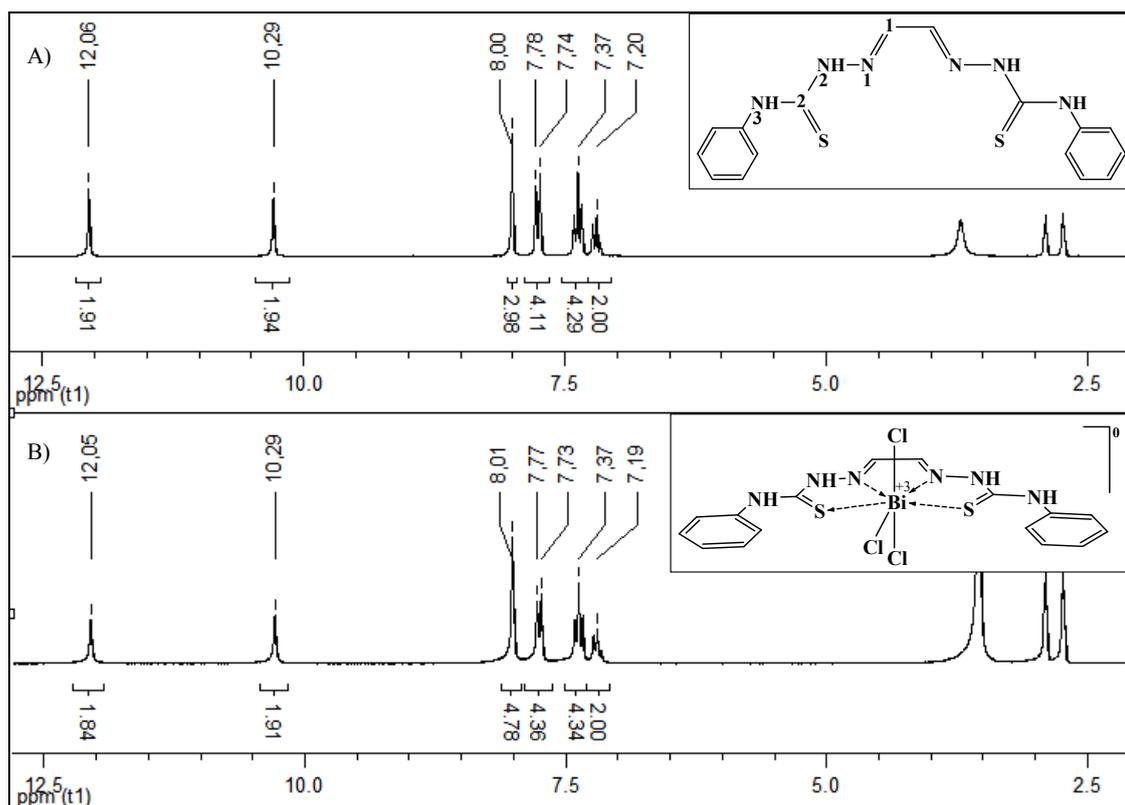


Figura 6.1.1.5. Espectros de RMN ^1H A) de $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$ e B) de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (**3**) em $\text{DMF-}d_7$.

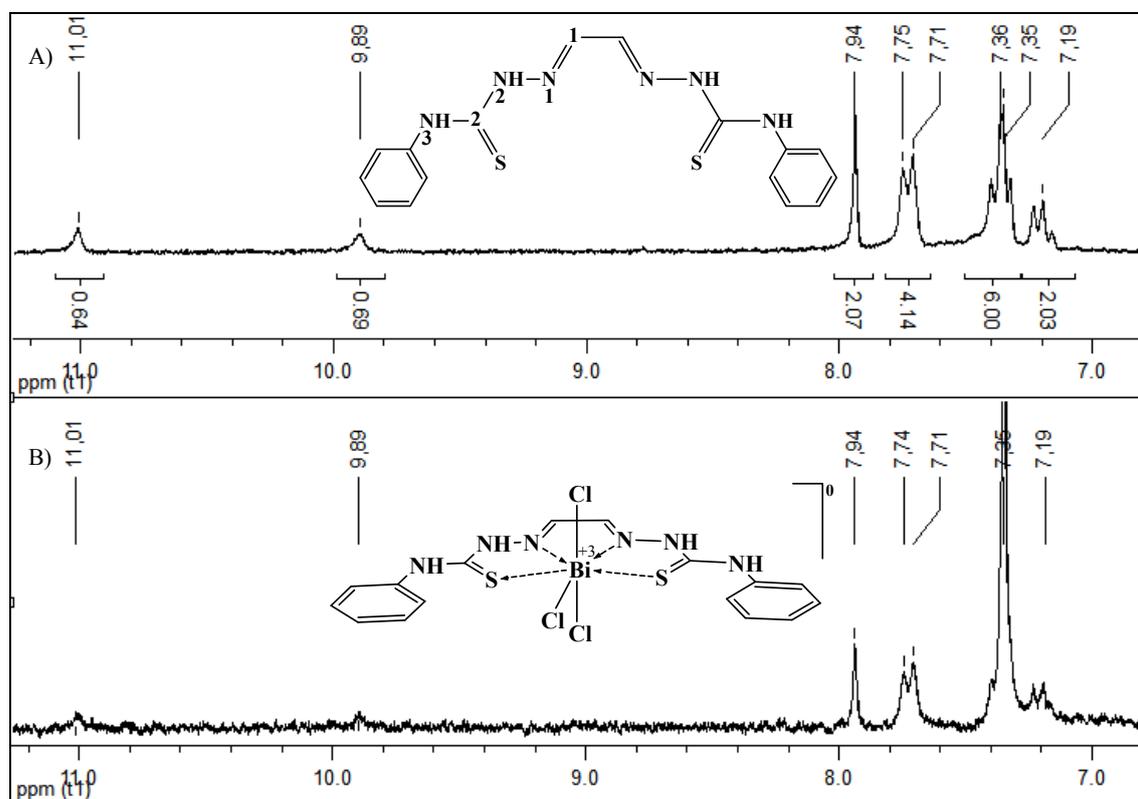


Figura 6.1.1.6. Espectros de RMN ^1H A) de $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$ e B) de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (**3**) em $\text{acetone-}d_6$. (faixa = 11,2 – 6,8 ppm).

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos (**1-3**) em $\text{DMSO-}d_6$, também se verifica pouca variação dos sinais de C(1) e C(2) das bis(tiossemicarbazonas) com a complexação. Como exemplo, na Figura 6.1.1.7 são apresentados os espectros de RMN de ^{13}C de $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$ e do complexo (**3**).

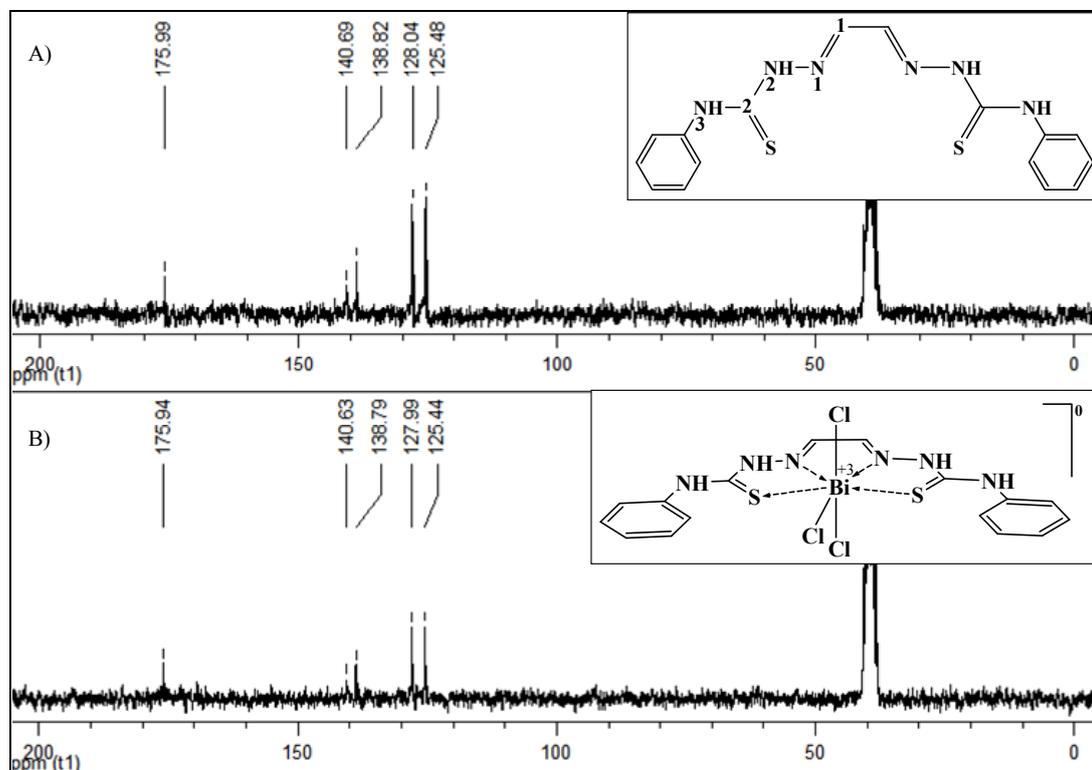


Figura 6.1.1.7. Espectros de RMN de ^{13}C A) de $\text{H}_2\text{Gy3Ph}$ e B) do complexo $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (**3**) em $\text{DMSO-}d_6$.

Os sinais não estão duplicados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos (**1-3**), indicando que os dois lados das bis(tiossemicarbazonas) coordenam-se de modo semelhante ao íon metálico.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C das bis(tiossemicarbazonas) e dos complexos (**1-3**) são apresentados na Tabelas 6.1.1.3 e 6.1.1.4.

Tabela 6.1.1.3. Atribuições (A), multiplicidade (M)^a, número de hidrogênios (n^o) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (**3**) em comparação com as bis(tiossemicarbazonas) ($\text{H}_2\text{L}_1\text{-H}_2\text{L}_3$)^b ($\text{DMSO-}d_6$)

A	n ^o	M	H_2L_1	(1)	M	H_2L_2	(2)	M	H_2L_3	(3)
H(1)	2	s	7,70	7,70	s	7,72	7,72	s	7,91	7,89
N(2)H	2	s	11,68	11,68	s	11,70	11,70	s	12,16	12,15
N(3)H	2	s	8,31	8,31	t	8,51	8,52	s	10,20	10,19
N(3)H ^o	2	s	7,88	7,88	-	-	-	-	-	-
H(3)	2	-	-	-	q	3,53	3,53	-	-	-
H(4)	3	-	-	-	t	1,10	1,10	-	-	-

^a s=simpleto; d= dupleto; t=tripleto e q=quarteto; ^b $\text{H}_2\text{L}_1 = \text{H}_2\text{Gy3DH}$, $\text{H}_2\text{L}_2 = \text{H}_2\text{Gy3Et}$ e $\text{H}_2\text{L}_3 = \text{H}_2\text{Gy3Ph}$

Tabela 6.1.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (D) de $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})\text{Cl}_3]$ (**1**), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (**2**) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})\text{Cl}_3]$ (**3**) em comparação com as *bis*(tiossemicarbazonas) (H_2L_1 - H_2L_3)^a ($\text{DMSO}-d_6$)

A	D	$\text{H}_2\text{Gy3DH}$	(1)	D	$\text{H}_2\text{Gy3Et}$	(2)	D	$\text{H}_2\text{Gy3Ph}$	(3)
C2=S	-	177,99	177,95	-	176,40	176,36	-	175,99	175,94
C1=N	↑	140,52	140,54	↑	140,01	139,98	↑	140,69	140,63
C3	-	-	-	↓	38,34	38,33	-	-	-
C4	-	-	-	↑	14,31	14,29	-	-	-

^a $\text{H}_2\text{L}_1 = \text{H}_2\text{Gy3DH}$, $\text{H}_2\text{L}_2 = \text{H}_2\text{Gy3Et}$ e $\text{H}_2\text{L}_3 = \text{H}_2\text{Gy3Ph}$

Espectros eletrônicos

Os espectros eletrônicos das *bis*(tiossemicarbazonas) livres apresentam bandas em 367–349 nm ($\varepsilon = 4,70 \times 10^4 - 5,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), atribuídas a transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometina e tioamida³. Com a coordenação, não se verifica deslocamento significativo das referidas bandas nos espectros dos complexos (**1**) e (**2**). Entretanto, foi observado um efeito hiperacrômico ($\varepsilon = 1,18 \times 10^5 - 7,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) com a complexação. Para o complexo (**3**), por sua vez, foi verificado um efeito hipocrômico das bandas dos grupos azometina e tioamida, assim como uma maior separação entre essas bandas, que ocorrem em 356 ($\varepsilon = 2,87 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) e 376 nm ($\varepsilon = 2,36 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). A mudança na intensidade das bandas de azometina e tioamida com a coordenação poderia estar associada a algum efeito do íon bismuto(III) sobre o esqueleto das *bis*(tiossemicarbazonas). Uma nova transição foi observada nos espectros eletrônicos dos complexos (**1-3**) ($\varepsilon = 1,13 \times 10^4$ e $2,72 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ respectivamente), a qual poderia ser atribuída a uma transição de transferência de carga.

Dentre as duas técnicas de caracterização em solução utilizadas, RMN e espectroscopia eletrônica, esta última permitiu observar diferença significativa entre o perfil espectral de *bis*(tiossemicarbazonas) e dos complexos (**1-3**) (Figura 6.1.1.8), confirmando assim que ocorreu a complexação.

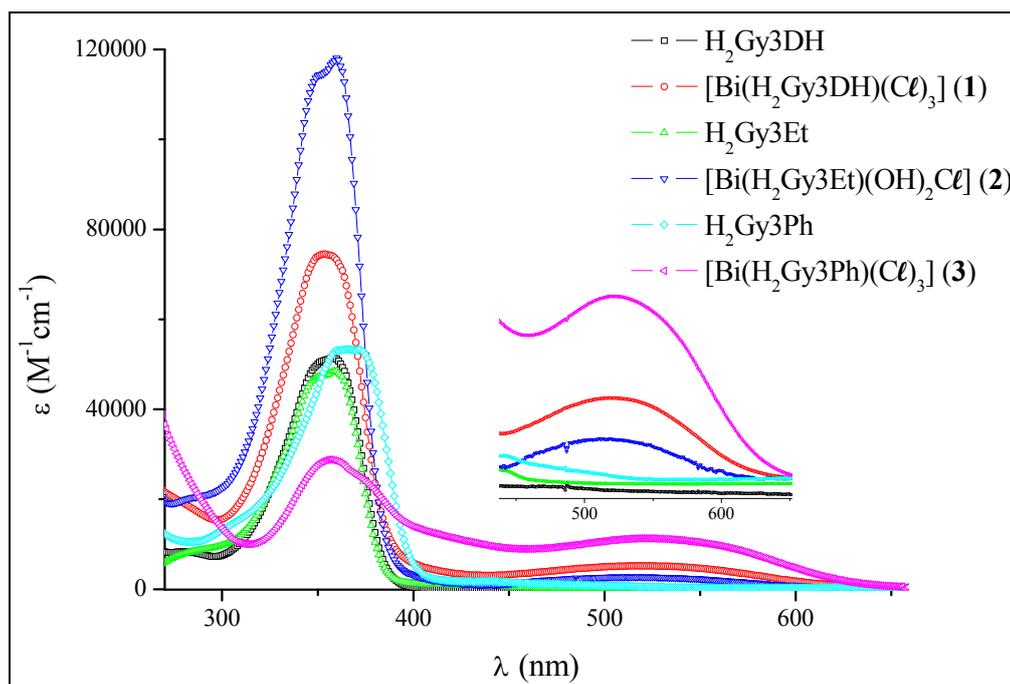


Figura 6.1.1.8. Espectros eletrônicos das *bis*(tiossemicarbazonas) livres e de seus complexos $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3DH})(\text{Cl})_3]$ (1), $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Et})(\text{OH})_2\text{Cl}]$ (2) e $[\text{Bi}(\text{H}_2\text{Gy3Ph})(\text{Cl})_3]$ (3).

Com base nas caracterizações realizadas, foram propostas as estruturas para os complexos (1-3) (ver Figura 6.1.1.2). Assim, foi proposto que o bismuto(III) se encontra heptacoordenado e que as *bis*(tiossemicarbazonas) se coordenam ao íon metálico pelo sistema $\text{N}_2\text{-S}_2$. Esta proposta é coerente, pois são observados compostos em que o número de coordenação do bismuto varia de 3 a 10^{15} . A literatura relata complexos de bismuto(III) com *bis*(tiossemicarbazonas) e *bis*(semicarbazonas) em que o íon metálico está ligado aos enxofres ou oxigênios e aos nitrogênios do grupo azometina^{16,17}. A literatura também relata complexos de bismuto(III) que contêm hidróxido como ligante (como no complexo (2)) e complexos de bismuto(III) heptacoordenado¹⁸. Na Figura 6.1.1.9 são apresentados alguns exemplos.

¹⁵ N. Yang, H. Sun. *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 2354.

¹⁶ L.P. Battaglia, A. B. Corradi, C. Pelizzi, G. Pelosi, P. Tarasconi. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1990) 3857.

¹⁷ K. Nomiya, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, N.C. Kasuga, H. Yokoyama, S. Nakano, K. Onodera. *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 601.

¹⁸ L.P. Battaglia, A.B. Corradi, G. Pelosi, P. Tarasconi, C. Pelizzi, *J. Chem.Soc.,Dalton Trans.* (1989) 671.

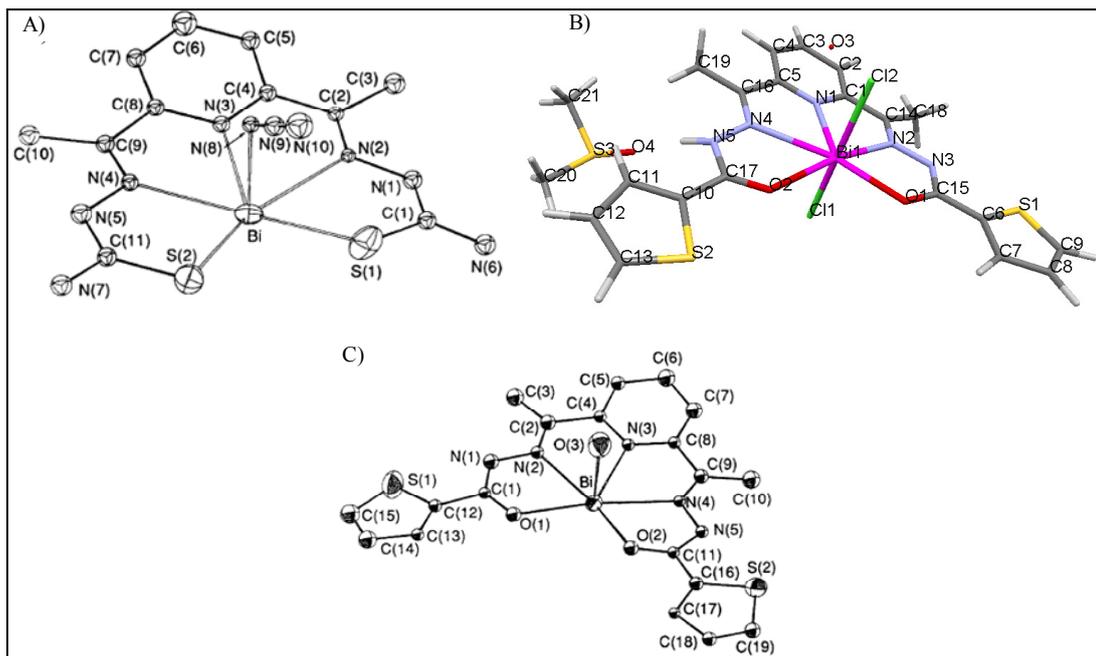


Figura 6.1.1.9. Estruturas de complexos de bismuto(III) com *bis*(tiossemicarbazonas) e *bis*(semicarbazonas): A) [Bi(dapts)(N₃)] (H₂dapts = 2,6-diacetilpiridina *bis*(tiossemicarbazona)¹⁶, B) [Bi(Hdapt)Cl₂]·DMSO·H₂O¹⁸ e C) [Bi(dapt)(OH)] (H₂dapt = 2,6-diacetilpiridina *bis*(2-tiofenil hidrazona)¹⁶.

6.1.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Foi investigado o efeito de *bis*(tiossemicarbazonas) e complexos de bismuto(III) sobre o crescimento bactérias *gram*-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

Atividade antibacteriana

Foram testadas as atividades antimicrobianas das *bis*(tiossemicarbazonas) e de seus complexos de bismuto(III) (1-3) com o objetivo de avaliar o efeito da coordenação sobre a atividade. Os valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) determinados para os compostos estão na Tabela 6.1.2.1.

Tabela 6.1.2.1. Concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* das *bis*(tiossemicarbazonas), seus complexos de bismuto(III) [Bi(H₂Gy3DH)Cl₃] (1), [Bi(H₂Gy3Et)(OH)₂Cl] (2), [Bi(H₂Gy3Ph)Cl₃] (3), cloridrato de tetraciclina e ciprofloxacina

Composto	CIM (μmol L ⁻¹)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
H ₂ Gy3DH	> 509,1	> 504,21	> 509,10
1	> 100,1	> 196,30	190,52
H ₂ Gy3Et	> 205,5	> 384,40	> 384,05
2	11,1	> 181,88	193,01
H ₂ Gy3Ph	> 144,5	> 274,92	286,14
3	2,4	> 101,22	17,86
Cloridrato de tetraciclina	0,3	-	-
Ciprofloxacina	-	1,37	1,27

As bis(tiossemicarbazonas) não são ativas ou apresentam baixa atividade contra os microorganismos testados. A coordenação a bismuto(III) faz aumentar significativamente a ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. faecalis*. A maior atividade foi verificada para o complexo (3), cujos valores de CIM (CIM = 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra *S. aureus* e 17,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra *E. faecalis*) são comparáveis aos dos fármacos controle. Não foi possível determinar a CIM para os complexos (1-3) contra *S. epidermidis*.

Assim como observado para os complexos de bismuto(III) com tiossemicarbazonas derivadas de piridina (Capítulo 5), a coordenação a bismuto(III) constituiu, portanto, uma estratégia interessante de redução de doses contra *S. aureus* e *E. faecalis*. O íon metálico parece exercer um papel importante na atividade antimicrobiana dos compostos.

6.2. Complexos de ouro(III) e ouro(I) com glioxaldeído bis(tiossemicarbazona) ($\text{H}_2\text{Gy3DH}$) e seus derivados *N*(3)-metil ($\text{H}_2\text{Gy3Me}$) e *N*(3)-etil ($\text{H}_2\text{Gy3Et}$)

6.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE OURO(I) E OURO(III)

Foram sintetizados complexos de ouro(I) e ouro(III) com glioxaldeído bis(tiossemicarbazona) ($\text{H}_2\text{Gy3DH}$) e seus derivados *N*(3)-metil- ($\text{H}_2\text{Gy3Me}$) e *N*(3)-etil- ($\text{H}_2\text{Gy3Et}$) substituídos (Figura 6.2.1.1): $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (2) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3) (Figura 6.2.1.2). Os complexos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar, por seus espectros eletrônicos, de infravermelho e de ressonância magnética nuclear e por eletroquímica (voltametria cíclica).

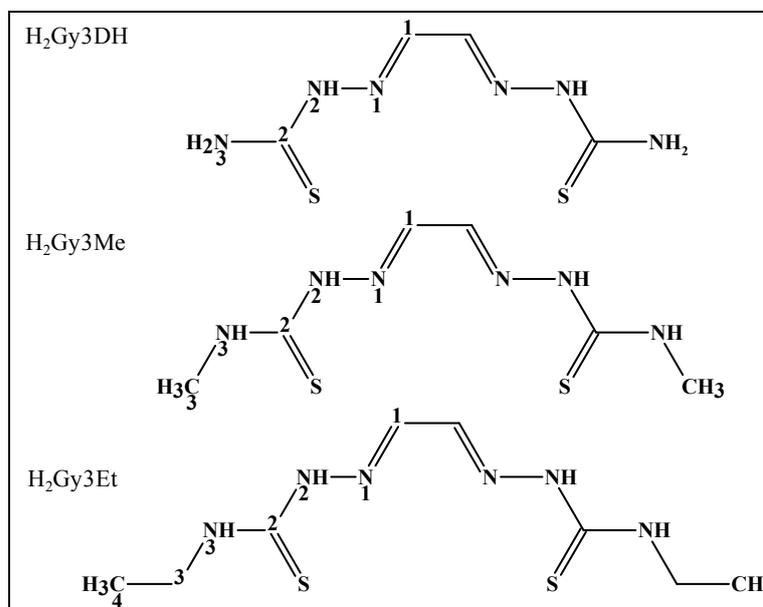


Figura 6.2.1.1. Estruturas das bis(tiossemicarbazonas) $\text{H}_2\text{Gy3DH}$, $\text{H}_2\text{Gy3Me}$ e $\text{H}_2\text{Gy3Et}$, utilizadas nas sínteses dos complexos (1-3), e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

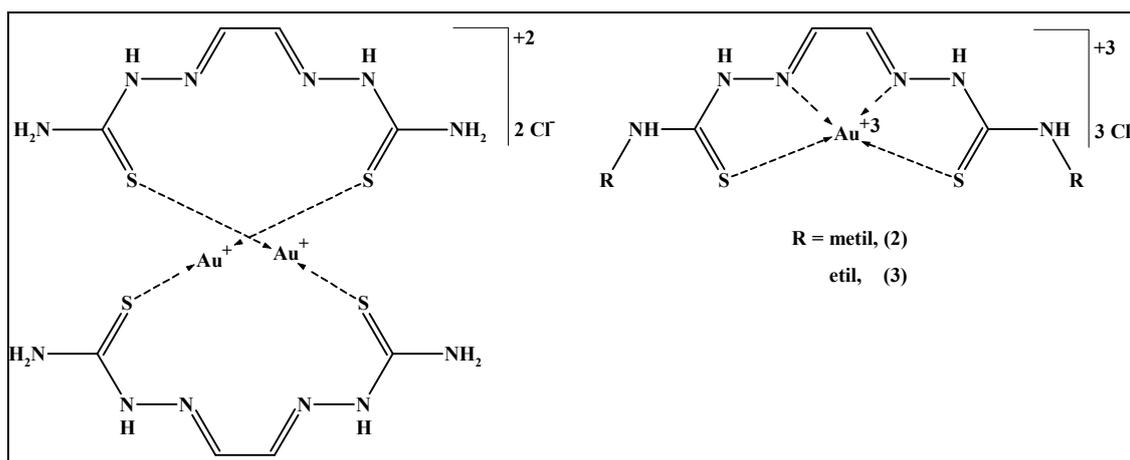


Figura 6.2.1.2. Estruturas propostas para os complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (2) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (3).

Microanálises, massas molares e condutividade molar

Os resultados das análises sugerem a formação de complexos dos tipos $[\text{Au}(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}]$ ou $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{L})_2]\text{Cl}_2$ para o complexo (1) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{L})]\text{Cl}_3$ para os complexos (2) e (3), nos quais as moléculas de *bis*(tiossemicarbazonas) encontram-se coordenadas ao metal sob a forma neutra (H_2L).

Não foi realizada análise condutimétrica para o complexo (1) devido à sua baixa solubilidade nos solventes geralmente utilizados nessa análise¹⁹. 1 poderia ser um monômero, no qual $\text{H}_2\text{Gy3DH}$ provavelmente estaria coordenado ao centro metálico pelo enxofre, juntamente com um cloreto. O complexo (1) também poderia ser um dímero de ouro(I), com duas moléculas de $\text{H}_2\text{Gy3DH}$ coordenadas a dois centros de ouro(I) e dois cloretos atuando como contra-íons. Conforme mostrado por espectros de infravermelho e de ressonância magnética nuclear (a seguir), a fórmula proposta para o complexo (1) é $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{L})_2]\text{Cl}_2$.

Durante a reação de síntese do complexo (1) ocorreu a redução de ouro(III) para ouro(I), sendo que esse comportamento foi observado na obtenção de outros complexos de ouro²⁰. É possível que $\text{H}_2\text{Gy3DH}$ tenha reduzido o íon ouro(III), considerando-se que tiossemicarbazonas exibem propriedades redutoras²¹. Entretanto, uma vez que o complexo (1) foi obtido com bom rendimento, é possível que também tenha ocorrido redução de ouro(III) com a oxidação de metanol durante a síntese.

De acordo com análise elementar, os complexos (2) e (3) apresentam três cloretos em sua estrutura, sugerindo que se tratam de compostos de ouro(III). As análises condutimétricas ($\text{DMF} \sim 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) indicam que os complexos (2) e (3) apresentam condutividade molar em torno de $30,0 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Embora esses dados sejam compatíveis para compostos neutros¹⁹, foi proposto que 2 e 3 são eletrólitos 1:3. Valores de condutividade molar inferiores

¹⁹ W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.

²⁰ I.G. Santos, A. Hagenbach, U. Abram, *Dalton Trans.* (2004) 677.

²¹ R.H. U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 267.

ao esperado também foram observados para outros compostos de ouro, e os autores que os relatam justificaram a baixa condutividade pela possível forte interação entre íons cloreto e hidrogênios amínicos²². Os rendimentos das reações, massa molar, microanálises e condutividades molares dos complexos **1-3** são apresentados na Tabela 6.2.1.1.

Tabela 6.2.1.1. Rendimento (R), ponto de fusão^a, análise elementar^b, massa molar (MM) e condutividade molar (DMF, 1×10^{-3} mol L⁻¹) dos complexos [Au₂(H₂Gy3DH)₂]Cl₂ (**1**), [Au(H₂Gy3Me)]Cl₃ (**2**) e [Au(H₂Gy3Et)]Cl₃ (**3**)

Composto	R (%)	Ponto de fusão (°C)	%C	%H	%N	Fórmula mínima e MM (g mol ⁻¹)	Λ_M ($\Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
1	76,7	ND ^c (ND) ^c	11,30 (11,00)	2,06 (1,85)	19,42 (19,24)	C ₈ H ₁₆ Au ₂ Cl ₂ N ₁₂ S ₄ 873,42	-
2	51,9	221,3-221,7 (248,6-248,8)	13,89 (13,45)	1,93 (2,26)	15,61 (15,69)	C ₆ H ₁₂ AuCl ₃ N ₆ S ₂ 535,66	32,1
3	71,7	212,5-213,1 (251,2-251,4)	16,85 (17,05)	2,67 (2,86)	14,63 (14,91)	C ₈ H ₁₆ AuCl ₃ N ₆ S ₂ 563,71	26,1

^a Pontos de fusão das tiossemicarbazonas livres se encontram entre parênteses.

^b Valores teóricos se encontram entre parênteses.

^c ND = Não determinado. Até 280 °C o composto não fundiu.

Espectros de Infravermelho

Na Tabela 6.2.1.2 são apresentadas as principais bandas observadas nos espectros de infravermelho das *bis*(tiossemicarbazonas) e de seus complexos (**1-3**).

A banda $\nu(\text{CS})$ em $836\text{-}808 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros de infravermelho das *bis*(tiossemicarbazonas) livres encontra-se em menores frequências nos espectros de **1-3** ($819\text{-}804 \text{ cm}^{-1}$). O pequeno deslocamento é compatível com a ligação do metal ao enxofre na forma de tiona^{10,23,24}. O estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ em 1554 e 1521 cm^{-1} nos espectros de infravermelho de H₂Gy3Me e H₂Gy3Et encontra-se em 1574 e 1565 cm^{-1} nos espectros de **2** e **3**, respectivamente, sugerindo que ocorre a coordenação pelo nitrogênio imínico. Para o complexo (**1**) não foi observado deslocamento da banda de $\nu(\text{C}=\text{N})$ de H₂Gy3DH com a complexação, estando de acordo com a coordenação da *bis*(tiossemicarbazona) ao metal apenas pelos enxofres (ver Figura 6.2.1.3).

Para os complexos (**1-3**) verifica-se a permanência de todas as bandas atribuídas a vibrações de N-H, sugerindo que as *bis*(tiossemicarbazonas) estão coordenadas ao centro metálico em sua forma neutra. Esse comportamento é semelhante ao observado para os complexos de bismuto(III) com *bis*(tiossemicarbazonas) (ver seção 6.1).

²² J.S. Casas, M. V. Castaño, M.C. Cifuentes, J.C. García-Monteaquedo, A. Sánchez, J. Sordo, U. Abram, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 1009.

²³ T.S. Lobana, S. Khanna, R.J. Butcher, Inorg. Chem. Commun. 11 (2008) 1433.

²⁴ S.D. Khanye, N.B. Báthori, G.S. Smith, K. Chibale, Dalton Trans. 39 (2010) 2697.

Nos espectros de **1-3**, as absorções em 252-232 cm⁻¹ foram atribuídas à vibração $\nu(\text{Au-S})$ ^{25,26,27}. Além disso, absorções adicionais em 433 e 446 cm⁻¹ nos espectros de **2** e **3**, respectivamente, foram atribuídas à vibração $\nu(\text{Au-N}_{\text{imina}})$ ^{25,26,27}. Essas absorções não foram observadas no espectro do complexo (**1**), indicando que os nitrogênios imínicos não estão coordenados ao ouro(I).

Os resultados sugerem, portanto, que em **1** as bis(tiossemicarbazonas) estão coordenadas ao ouro(I) através dos átomos de enxofre, enquanto que em **2** e **3**, as bis(tiossemicarbazonas) estão coordenadas a ouro(III) pelo sistema quelante N₂S₂.

Tabela 6.2.1.2. Bandas^a selecionadas nos espectros de infravermelho (cm⁻¹) das bis(tiossemicarbazonas) e de [Au₂(H₂Gy3DH)₂]Cl₂ (**1**), [Au(H₂Gy3Me)]Cl₃ (**2**) e [Au(H₂Gy3Et)]Cl₃ (**3**)

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu\text{C=S}$	$\nu(\text{Au-S})$	$\nu(\text{Au-N})$
H ₂ Gy3DH	3387m, 3247m, 3164m	1606F	836m	-	-
1	3344m, 3244m, 3152m	1607F	819m	232f	-
H ₂ Gy3Me	3311m, 3145m	1554F	822f	-	-
2	3219m, 3124m	1574F	817f	252f	433f
H ₂ Gy3Et	3371m, 3133m	1521F	808m	-	-
3	3342m, 3120m	1565F	804m	241f	446f

^a As intensidades das bandas estão assinaladas como: F (forte), m (média) ou f (fraca).

²⁵ K.N. Kouroulis, S.K. Hadjikakou, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, L. Male, M. Hursthouse, S. Skoulika, A.K. Metsios, V.Y. Tyurin, A.V. Dolganov, E.R. Milaevag, N. Hadjiliadis, Dalton Trans. (2009) 10446.

²⁶ V.A. Afanasieva, L.A. Glinskaya, R.F. Klevtsova, I.V. Mironov, L.A. Sheludyakova, J. Struct. Chem. 46 (2005) 869.

²⁷ J.S. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, J. Ellena, A. Sánchez, J. Sordo, C. Taboada, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1858.

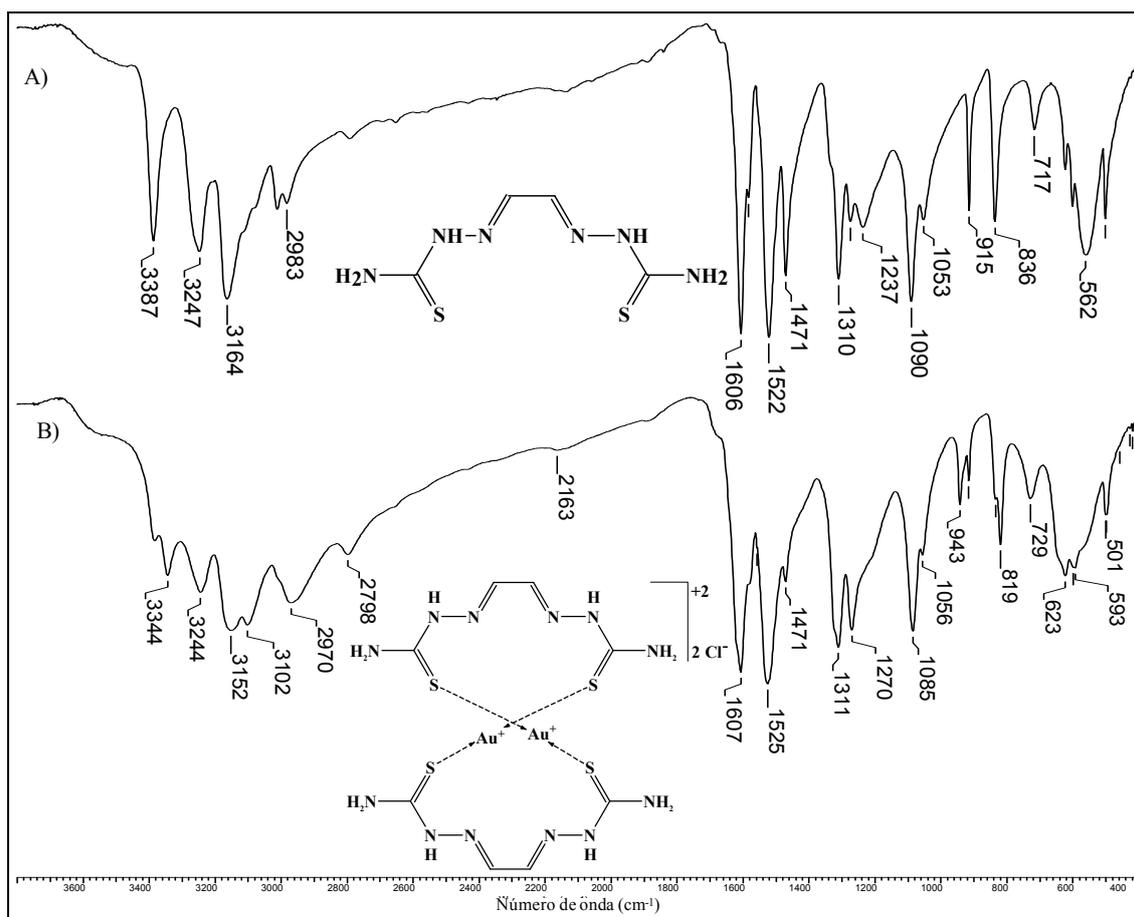


Figura 6.2.1.3. Espectros de infravermelho de A) $\text{H}_2\text{Gy3DH}$ e B) $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (**2**), obtidos em pastilha de KBr, na região de $3800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

Espectros de ressonância magnética nuclear

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos (**1-3**), todos os sinais dos hidrogênios dos ligantes sofrem deslocamentos com a coordenação. Para o complexo (**1**), por sua vez, verifica-se menor deslocamento dos sinais de RMN de ^1H , quando comparado com **2** e **3**. Em todos os complexos, as *bis*(tiossemicarbazonas) estão coordenadas ao centro metálico na forma neutra. Além disso, nos complexos (**1-3**), os dois “braços” das *bis*(tiossemicarbazonas) estão igualmente coordenados ao metal. Assim, é mais provável que o complexo (**1**) seja um dímero. Considerando-se que compostos de ouro(I) são lineares²⁸ e que o íon ouro(I) é um ácido macio, foi proposto que a esfera de coordenação de cada um dos dois centros metálicos presentes no complexo (**1**) é preenchida somente pelos átomos de enxofre das *bis*(tiossemicarbazonas). Essa proposta é razoável, uma vez que, por critério de maciez e dureza, o íon ouro(I) teria mais afinidade com o enxofre do que com o nitrogênio do ligante. Os dois cloretos presentes no complexo (**1**) estariam atuando como contra-íons. A literatura

²⁸ J. Huheey, L. R. Keiter. Coordination Chemistry: Bonding, spectra and magnetism. Inorganic Chemistry: Principles of structure and reactivity. 4. ed, New York: HarperCollins College Publishers (1993) 473.

também relata um composto de ouro(I) com *bis*(tiossemicarbazonas) cuja estrutura cristalográfica é semelhante à proposta apresentada para o complexo (**1**)²⁹ (ver Figura 6.2.1.4).

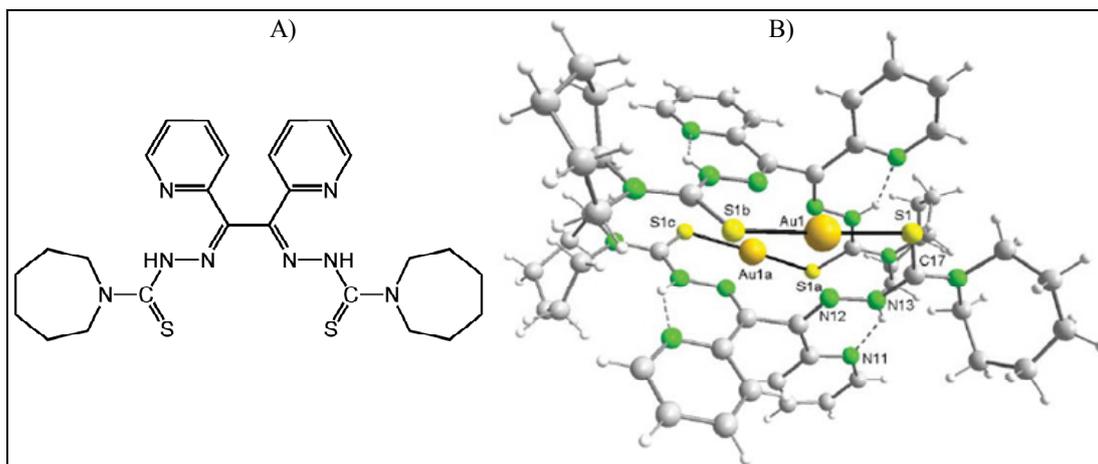


Figura 6.2.1.4. Estruturas de A) de piridil *bis*{3-hexametileno-iminiltiossemicarbazona} (H₂Plhexim) e B) de [Au(H₂Plhexim)]₂^{+2.29}.

Na Figura 6.2.1.5 é apresentado como exemplo, o espectro de RMN de ¹H do complexo[Au(H₂Gy3Et)]Cl₃ (**3**). Os sinais de RMN de ¹H dos complexos (**1-3**), em comparação com as *bis*(tiossemicarbazonas) livres são apresentados na Tabela 6.2.1.3.

Os espectros de RMN de ¹³C e DEPT foram obtidos apenas para o complexo (**3**), uma vez que os demais complexos apresentam baixa solubilidade em DMSO-*d*₆. Assim, nos espectros de RMN de ¹³C de **3** verifica-se o deslocamento de todos os sinais dos carbonos do ligante, sendo os deslocamentos mais pronunciados verificados para C=S e C=N (ver Figuras 6.2.1.6 e 6.2.1.7). Os sinais dos carbonos não estão duplicados, indicando que os dois braços da molécula do ligante coordenam-se de modo equivalente ao centro metálico. Dessa forma, os dados de RMN de ¹³C obtidos para o complexo (**3**) (Tabela 6.2.1.4) sugerem que H₂Gy3Et coordena-se ao centro metálico pelo sistema N₂S₂. Por similaridade estrutural, esta proposta foi estendida ao complexo (**2**).

²⁹ A. Castiñeiras, S. Dehnen, A. Fuchs, I. García-Santos, P. Sevillano, Dalton Trans. 15 (2009) 2731.

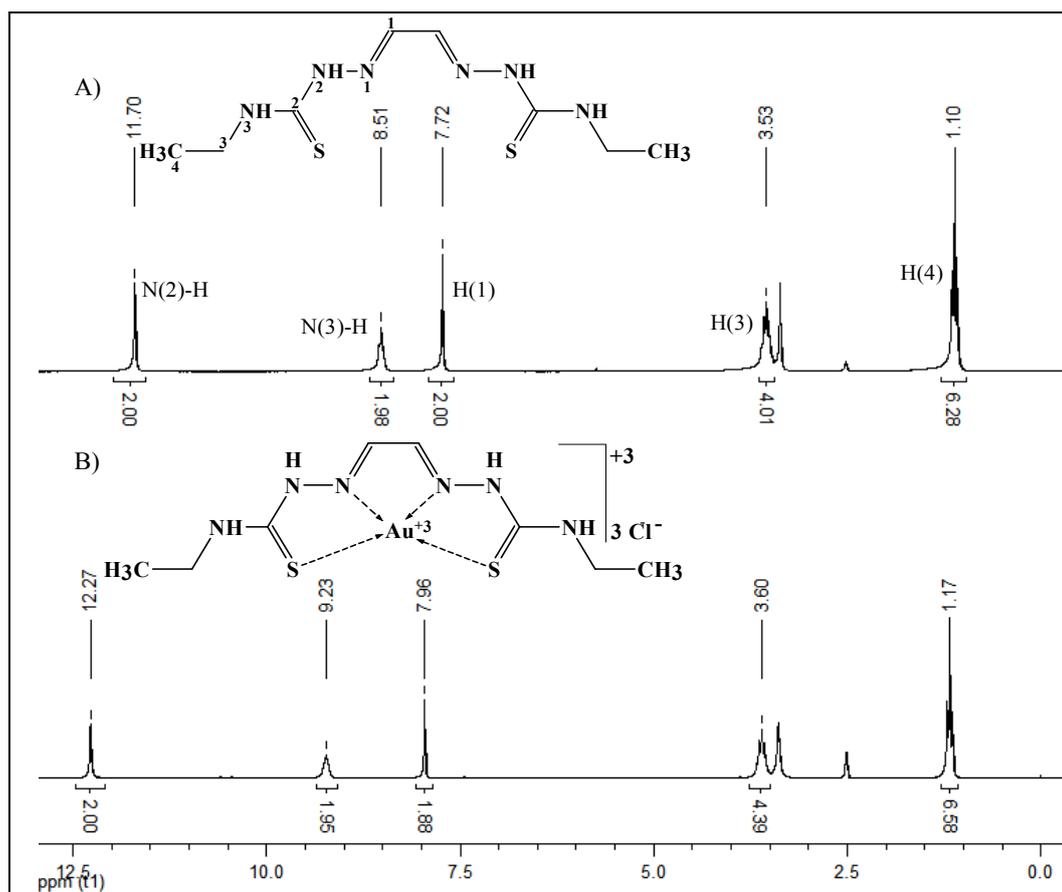


Figura 6.2.1.5. Espectros de RMN ^1H A) de $\text{H}_2\text{Gy3Et}$ e B) de $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (**3**) em $\text{DMSO-}d_6$.

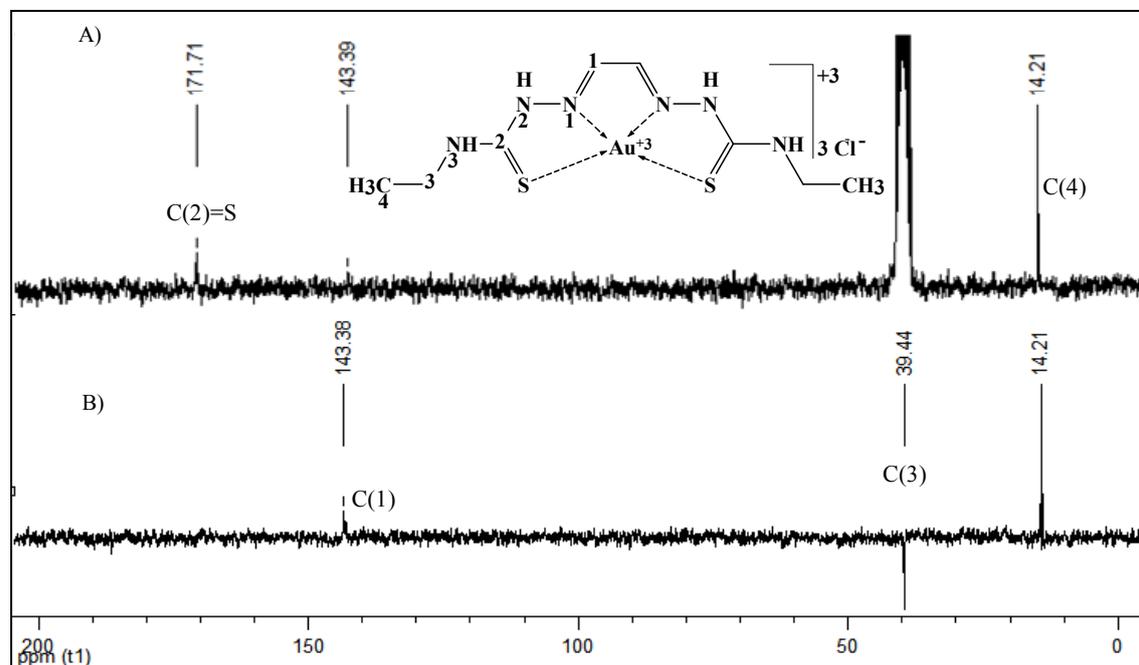


Figura 6.2.1.6. Espectros de A) RMN ^{13}C e B) DEPT de $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (**3**) em $\text{DMSO-}d_6$.

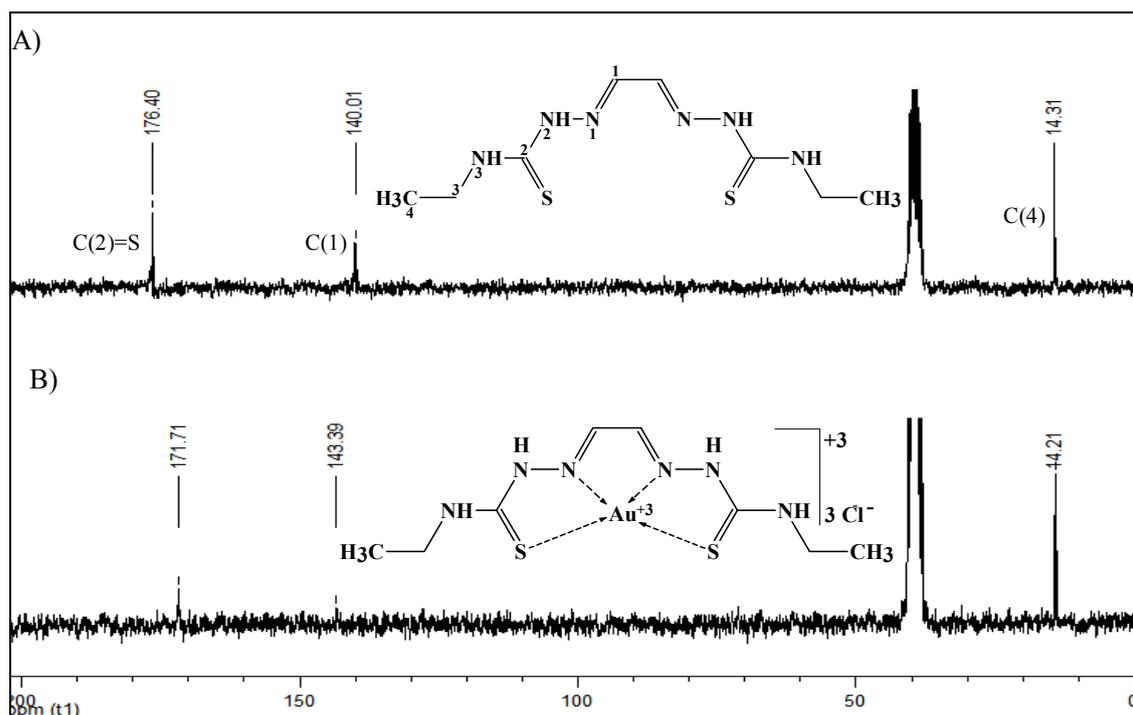

 Figura 6.2.1.7. Espectros de RMN de ^{13}C : A) de $\text{H}_2\text{Gy3Et}$ e B) de $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (**3**) em $\text{DMSO-}d_6$.

Tabela 6.2.1.3. Atribuições (A), multiplicidade (M)^a, número de hidrogênios (n°) e deslocamentos químicos (em ppm) dos principais sinais de RMN de ^1H de $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$ (**1**), $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ (**2**) e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (**3**) em comparação com as bis(tiossemicarbazonas) $\text{H}_2\text{L}_1 - \text{H}_2\text{L}_3$ ^b ($\text{DMSO-}d_6$)

A	n°	M	H_2L_1	(1)	n°	M	H_2L_2	(2)	n°	M	H_2L_3	(3)	n°
H(1)	2	s	7,70	7,73	2	s	7,71	7,94	2	S	7,72	7,96	2
N(2)H	2	s	11,68	11,78	2	s	11,74	12,29	2	s	11,70	12,27	2
N(3)H	2	s	8,31	8,42	2	q	8,47	9,15	2	t	8,51	9,23	2
N(3)H'	2	s	7,88	7,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H(3)	-	-	-	-	6	d	2,95	3,06	4	q	3,53	3,60	-
H(4)	-	-	-	-	-	-	-	-	6	t	1,10	1,17	2

^a s=simpleto; d= duplete; t=tripleto e q=quarteto.

^b $\text{H}_2\text{L}_1 = \text{H}_2\text{Gy3DH}$, $\text{H}_2\text{L}_2 = \text{H}_2\text{Gy3Me}$ e $\text{H}_2\text{L}_3 = \text{H}_2\text{Gy3Et}$.

Tabela 6.2.1.4. Atribuições (A) e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (D) de $\text{H}_2\text{Gy3Et}$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ (**3**) ($\text{DMSO-}d_6$)

A	D	$\text{H}_2\text{Gy3Et}$	(3)
C(2)=S	-	176,40	171,71
C(1)=N	↑	140,41	143,39
C(3)	↓	38,34	39,44
C(4)	↑	14,31	14,21

Espectros eletrônicos

Os espectros eletrônicos das *bis*(tiossemicarbazonas) e de seus complexos (**1-3**) foram obtidos em DMF. Entretanto, não foi determinado o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para **1**, pois este complexo não solubilizou completamente no solvente utilizado. Assim o espectro eletrônico de **1** é apresentado para fins de comparação com o perfil espectral dos demais complexos (Figura 6.2.1.8).

Nos espectros eletrônicos de H₂Gy3Me e H₂Gy3Et são observadas duas bandas em torno de 349 e 359 nm ($\epsilon = 4,13 \times 10^4 - 4,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), atribuídas às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometina e tioamida, respectivamente³.

Nos espectros dos complexos (**2**) e (**3**) foi observado um deslocamento batocrômico, juntamente com um efeito hipocrômico ($\epsilon = 2,45 \times 10^4 - 2,99 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) das transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometina e tioamida. Além disso, transições de transferências de carga ligante para o metal S \rightarrow ouro(III) e N \rightarrow ouro(III) foram verificadas na região de 390-450 nm. Essas bandas não são observadas no espectro do complexo (**1**).

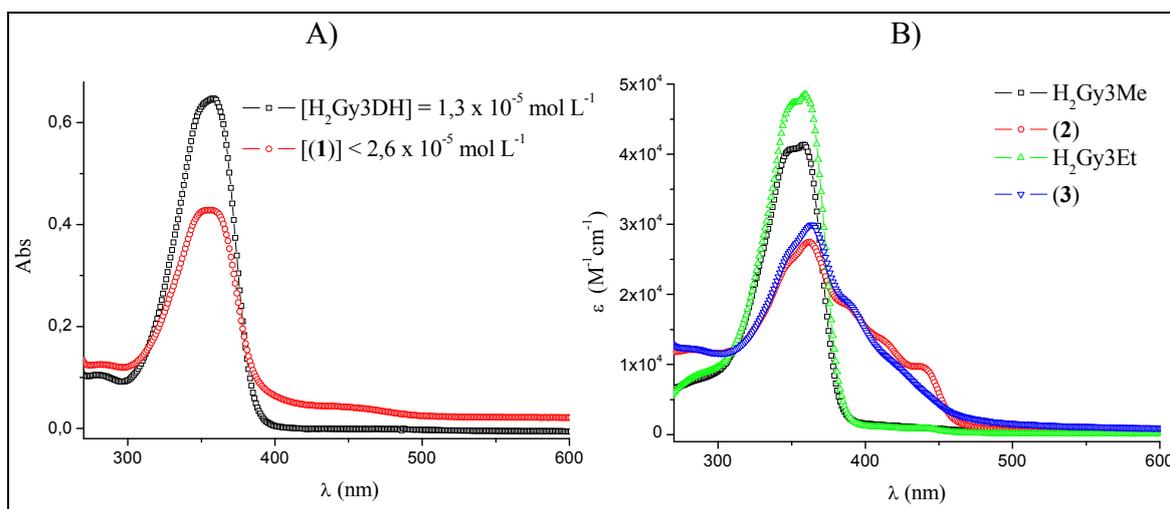


Figura 6.2.1.8. Espectros eletrônicos de A) H₂Gy3DH e **1** e de B) H₂Gy3Me, H₂Gy3Et, **2** e **3**.

Voltamogramas cíclicos

O íon ouro(III) foi reduzido durante a síntese do complexo (**1**), enquanto que o mesmo não foi observado para os complexos (**2**) e (**3**). Assim, foi investigado o comportamento eletroquímico das *bis*(tiossemicarbazonas), com o objetivo de avaliar seu potencial em reduzir ouro(III). Também foram obtidos voltamogramas cíclicos de **1-3** para identificar comportamentos distintos entre compostos de ouro(I) e ouro(III).

As *bis*(tiossemicarbazonas) apresentam o perfil dos voltamogramas cíclicos similar (Figura 6.2.1.9A). Os processos de oxidação estão correlacionados com os processos de redução em -0,789 a -1,522 V vs eletrodo normal de hidrogênio (ENH), enquanto que o processo de redução em -1,668 a 1,722 V vs ENH é irreversível, conforme ilustrado pelos

voltamogramas cíclicos de H₂Gy3Et obtidos em quatro diferentes faixas de varredura do potencial (Figura 6.2.1.9B).

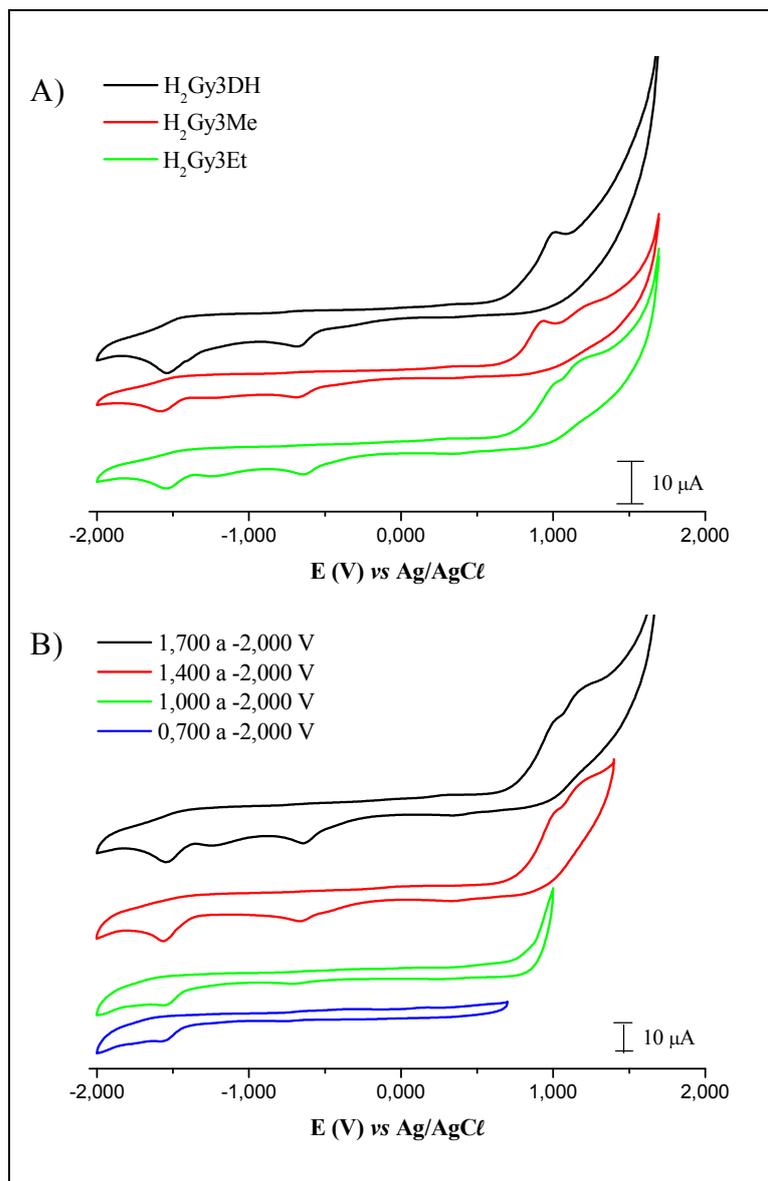


Figura 6.2.1.9. Voltamogramas cíclicos A) das bis(tiossemicarbazonas) H₂Gy3DH, H₂Gy3Me e H₂Gy3Et e B) de H₂Gy3Et obtidos em quatro faixa de potencial, evidenciando a dependência entre os processos redox. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹ (DMF).

A oxidação de tiossemicarbazonas tem sido relatada e foi relacionada à formação de produtos cíclicos, como os tiadiazóis³⁰. Processos catódicos, por sua vez, podem ser atribuídos à redução do grupo C=S, com base em relatos anteriores^{31,32}.

³⁰ S.A.M. Refaey, A.A. Hassan, H.S. Shehata, Int. J. Electrochem. Sci. 3 (2008) 325.

³¹ R.C. Evans, P. Douglas, C.J. Winscom, J. Fluoresc. 19 (2009) 169.

³² T. Zhang, J. Wang, Z. Tai, S. Zhu, J. Electroanal. Chem. 393 (1995) 55.

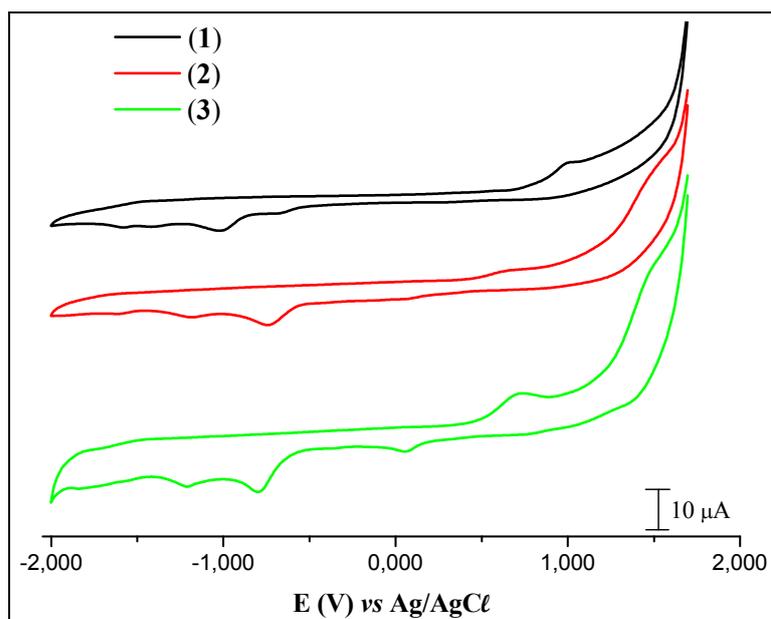


Figura 6.2.1.10. Voltamogramas cíclicos dos complexos (1-3) obtidos em DMF sob atmosfera de nitrogênio. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

Os voltamogramas cíclicos obtidos para os complexos (1-3) são apresentados na Figura 6.2.1.10. Os processos associados às *bis*(tiossemicarbazonas) estão ligeiramente deslocados nos voltamogramas de 1-3. Os complexos (2) e (3) apresentam comportamento eletroquímico similar em solução, o qual difere do comportamento eletroquímico do complexo (1), sugerindo em princípio que o estado de oxidação do íon metálico presente em 1 é diferente de 2 e 3. Posteriormente o comportamento químico de 1-3 foi comparado com o de HAuCl_4 , com o intuito de se obter informação sobre o estado de oxidação do íon metálico presente nesses complexos. Não foram observadas similaridades entre os voltamogramas de 1 e HAuCl_4 (Figura 6.2.1.11A). Além disso, foi observado apenas um pico catódico adicional em $-1,168 \text{ V vs ENH}$ no voltamograma do complexo (1), o qual pode ser atribuído ao processo $\text{ouro(I)} \rightarrow \text{ouro(0)}$.

Nos complexos (2) e (3) foi observado mais de um pico, atribuído a processos redox do centro metálico, os quais também estão presentes no voltamograma de HAuCl_4 . Um processo *quasi-reversível* em $0,236$ e $0,268 \text{ V vs ENH}$ para 2 e 3 respectivamente, ausente nos voltamogramas de $\text{H}_2\text{Gy3Me}$ e $\text{H}_2\text{Gy3Et}$, porém presente em HAuCl_4 , foi atribuído a $\text{ouro(II)} \rightarrow \text{ouro(I)}$ / $\text{ouro(I)} \rightarrow \text{ouro(II)}$. Os demais processos redox observados em HAuCl_4 e ausentes nos complexos (2) e (3) podem estar sobrepostos aos processos redox dos ligantes. Assim, os resultados confirmam a presença de ouro(III) nas estruturas de 2 e 3. Na Figura 6.2.1.11B é apresentado como exemplo o voltamograma de $\text{H}_2\text{Gy3Et}$, 3 e HAuCl_4 .

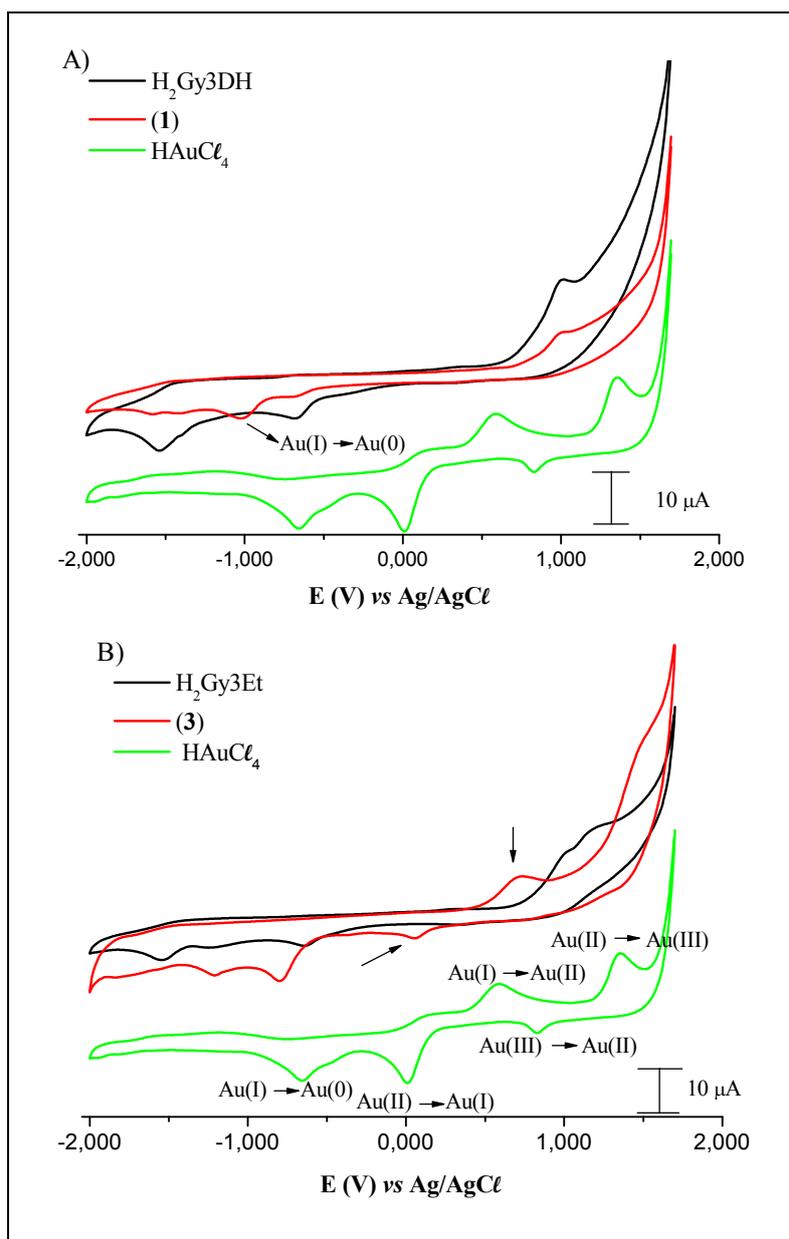


Figura 6.2.1.11. Comparação entre comportamentos eletroquímicos de A) H_2Gy3DH , **1** e H_2AuCl_4 e de B) H_2Gy3Et , **3** e H_2AuCl_4 . Processos redox atribuídos ao centro metálico nos complexos são indicados por setas.

Os dados obtidos por voltametria cíclica de *bis*(tiossemicarbazonas) e complexos (**1-3**) estão relacionados na Tabela 6.2.1.5. Infelizmente, de acordo com esses dados, não foi possível relacionar o potencial de oxidação das *bis*(tiossemicarbazonas) com suas potenciais capacidades em reduzir ouro(III) e assim justificar a presença de ouro(I) em apenas um dos três complexos. Por outro lado, os estudos permitiram diferenciar os estado de oxidação do íon ouro nos complexos (**1-3**), estando de acordo com as análises anteriores.

Tabela 6.2.1.5. Dados voltamétricos de bis(tiossemicarbazonas) e dos complexos [Au₂(H₂Gy3DH)₂]Cl₂ (**1**), [Au(H₂Gy3Me)]Cl₃ (**2**) e [Au(H₂Gy3Et)]Cl₃ (**3**)

E (V vs ENH)	H ₂ Gy3DH	(1)	H ₂ Gy3Me	(2)	H ₂ Gy3Et	(3)	HAuCl ₄
E _{pa} ^a	0,890	-	1,076 0,797	- -	1,042 0,857	- -	0,508 1,274
E _{pc} ^b	-0,814 -1,522 -1,668	-0,826 -1,553 -1,724	-0,829 -1,361 -1,722	-0,867 -1,307 -1,712	-0,789 -1,394 -1,687	-0,928 -1,338 -1,968	0,747 -0,742 -0,074

^a E_{pa}: potencial de pico anódico; ^b E_{pc}: potencial de pico catódico. Processos atribuídos ao centro metálico estão em negrito e itálico.

6.2.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Foi investigada a atividade citotóxica dos complexos (**1-3**) contra as linhagens de células humanas HL-60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HCT-116 (carcinoma colorretal humano). Também foi investigada a capacidade dos compostos de inibir a atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR).

Atividade citotóxica

Na Figura 6.2.2.1 são apresentadas as porcentagens de proliferação de células tumorais tratadas com as bis(tiossemicarbazonas), seus complexos (**1-3**) e HAuCl₄ versus controle (células tratadas com DMSO, 0,1%). Os fármacos cisplatina e auranofina foram usados como controles positivos. O primeiro é um composto antitumoral amplamente empregado na clínica, enquanto que o segundo é utilizado no tratamento de artrite reumatóide. A auranofina também foi empregada como controle porque é um fármaco que contém ouro em sua estrutura e há relatos na literatura de que esse composto apresenta atividade citotóxica contra certas linhagens tumorais^{33,34}.

³³ A.G. Cox, K.K. Brown, E.S.J. Arner, M.B. Hampton, Biochem. Pharmacol. 76 (2008) 1097.

³⁴ E.R.T. Tiekink, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 225.

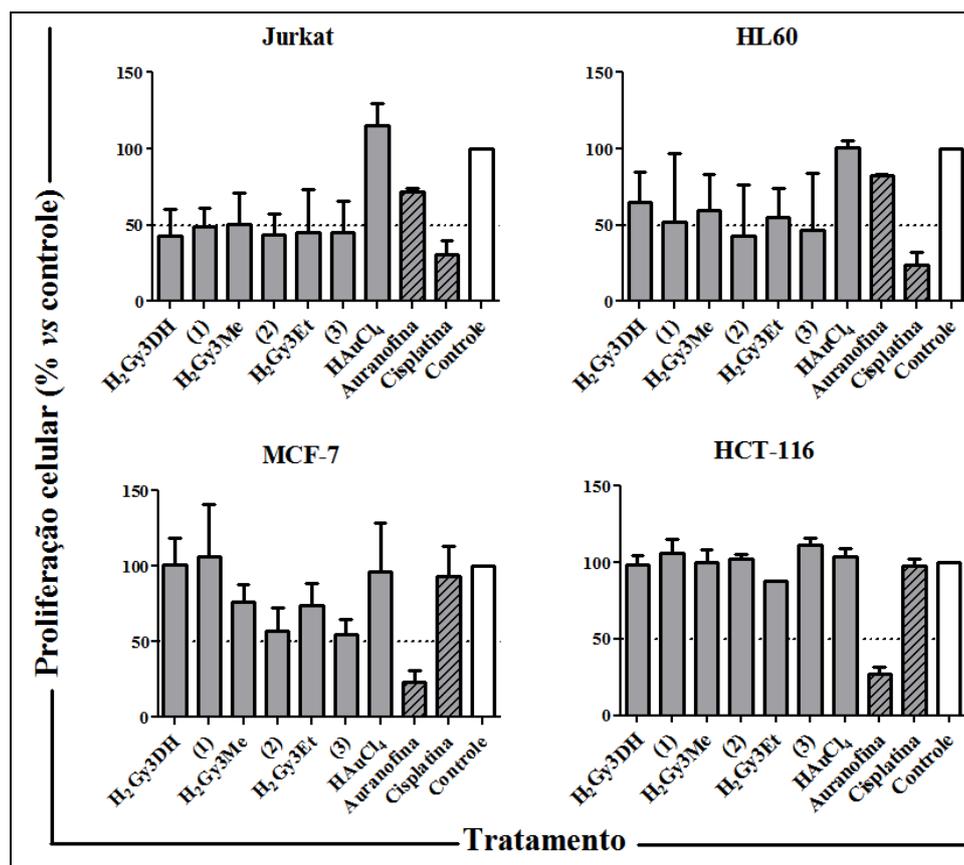


Figura 6.2.2.1. Efeito citotóxico de *bis*(tiossemicarbazonas), seus complexos (1-3), auranofina e cisplatina contra linhagens de células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116. As células foram tratadas com os compostos ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média \pm desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,1%) de três experimentos independentes realizados em triplicata.

De acordo com a Figura 6.2.2.1, em geral a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, as *bis*(tiossemicarbazonas) e seus complexos (1-3) demonstraram efeitos citotóxicos contra as linhagens de células tumorais, exceto contra HCT-116. As células leucêmicas Jurkat e HL-60 foram as mais sensíveis aos compostos. 1-3 foram tão citotóxicos contra células Jurkat quanto auranofina, porém foram menos ativos que auranofina contra células de tumores sólidos MCF-7 e HCT-116.

H₂Gy₃Me, H₂Gy₃Et e seus complexos de ouro(III) (2) e (3) foram mais ativos do que a cisplatina contra as células MCF-7. Além disso, nesse caso, a complexação a ouro(III) resultou em aumento da atividade citotóxica.

A auranofina revelou-se menos citotóxica frente às células leucêmicas do que frente às linhagens de tumores sólidos MCF-7 e HCT-116. Comportamento oposto foi observado para cisplatina. HAuCl₄ não apresentou efeito citotóxico contra todas as linhagens.

Inibição da atividade enzimática de tioredoxina redutase (TrxR)

A inibição de TrxR foi considerada um potencial mecanismo para a atividade anti-proliferativa dos complexos (1-3). Assim, foram investigadas as atividades inibitórias *in vitro* de TrxR promovidas por **2**, H₂Gy3Me, HAuCl₄ e auranofina. Foi realizado o ensaio de redução de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB).

2 inibiu a atividade enzimática, sendo a concentração necessária para inibir em 50% a atividade da enzima (CI₅₀) igual a 2,90 μmol L⁻¹ (Intervalo de confiança 95% = 2,49 a 3,37 μmol L⁻¹) (ver Figura 6.2.2.2), sugerindo que TrxR é um possível alvo biológico para a ação citotóxica do complexo.

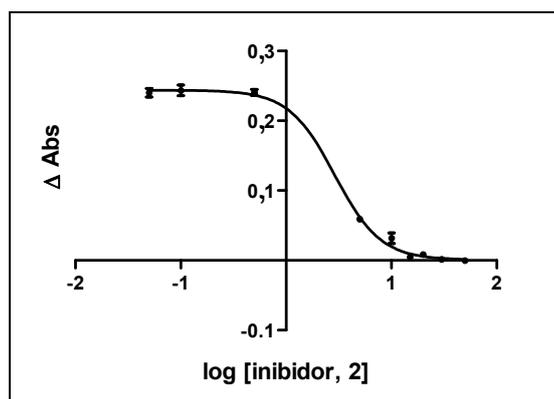


Figura 6.2.2.2. Efeito inibitório do complexo (2) sobre a atividade de TrxR. A curva log [inibidor, 2] vs resposta (absorbância) foi obtida para determinação de CI₅₀. TrxR foi tratada por 1 h a 37 °C com o complexo (2) em dez diferentes concentrações na faixa de 0,05 a 50 μmol L⁻¹ e a atividade da enzima foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Representação de dados de experimentos realizados em triplicata.

A capacidade do complexo (2) de inibir a atividade de TrxR foi comparada com as de H₂Gy3Me, HAuCl₄ e auranofina nas concentrações 0,5, 5,0 e 10 μmol L⁻¹ (Figura 6.2.2.3), sendo a última concentração a mesma utilizada nos ensaios da atividade antiproliferativa dos compostos (ver Figura 6.2.1.1).

Em 0,5 μmol L⁻¹, **2** não inibiu a atividade enzimática, enquanto que HAuCl₄ e auranofina promoveram sua inibição em 46,3 % e 71,0 %, respectivamente. Em 5,0 μmol L⁻¹, as porcentagens médias de inibição de TrxR foram: 76,5 % (**2**), 94,2 % (HAuCl₄) e 95,6 % (auranofina). Em 10 μmol L⁻¹, **2** inibiu em 87,4% a atividade de TrxR, enquanto que HAuCl₄ e auranofina promoveram sua inibição em 97,3 % e 96,4%, respectivamente. H₂Gy3Me não promoveu inibição de TrxR nas três concentrações utilizadas.

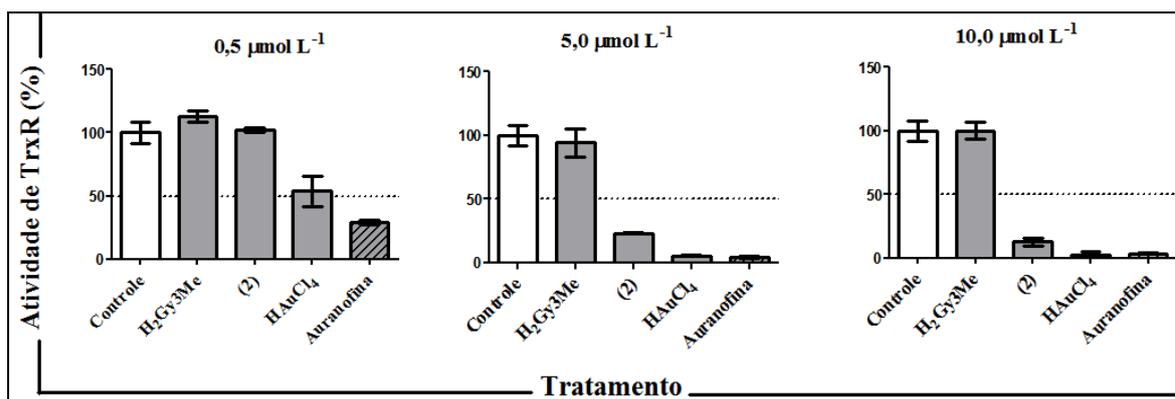


Figura 6.2.2.3. Efeito inibitório de H₂Gy3Me, **2**, HAuCl₄ e auranofina sobre a atividade de TrxR. A enzima foi incubada com DMF 2,5% (controle) e com os compostos nas concentrações 0,5, 5,0 e 10,0 μmol L⁻¹ por 1 h a 37 °C. Os dados são expressos como média ± desvio padrão da atividade de TrxR.

Uma vez que não apenas o complexo de ouro (**2**) e a auranofina, como também HAuCl₄ promoveram alta inibição da atividade enzimática, o efeito inibitório de TrxR está relacionada à presença do íon metálico. No entanto, embora HAuCl₄ iniba a atividade de TrxR, este composto não exibiu atividade citotóxica contra as linhagens HL-60, Jurkat, MCF-7 e HCT-116. O caráter hidrofílico de HAuCl₄ provavelmente impede sua passagem pela membrana celular. Diferente de HAuCl₄, o complexo (**2**) não apenas inibiu a atividade de TrxR, como também apresentou efeitos citotóxicos, sugerindo que a *bis*(tiossemicarbazona) H₂Gy3Me, além de seu efeito citotóxico intrínseco, também atuou como carreador do metal para o interior das células.

Entretanto, diferente do comportamento mostrado pelos complexos de ouro(I) com mono tiossemicarbazonas derivadas de piridina (capítulo 5), em geral não foi observado aumento ou houve aumento pouco expressivo da atividade citotóxica dos complexos (**1-3**) em relação às *bis*(tiossemicarbazonas) livres. Nos complexos de ouro(I) apresentados no capítulo 5, o íon ouro(I) está coordenado a um cloreto (ligante lábil) e à tiossemicarbazona monodentada, ligada ao metal pelo átomo de enxofre. Dessa forma foi sugerido que ocorreria a dissociação desses complexos no meio celular, levando à atuação do íon metálico, através da inibição de TrxR, e das tiossemicarbazonas, através da inibição de RDR, ou seja, sobre alvos diferentes.

Provavelmente para os complexos (**1-3**) a coordenação da *bis*(tiossemicarbazonas) ao íon metálico levou à formação de compostos mais estáveis. No caso do complexo (**1**), o íon ouro(I) está coordenado a dois átomos de enxofre, cuja ligação possivelmente é mais forte do que a ligação Au-Cl. Para os complexos (**2**) e (**3**), a esfera de coordenação dos íons ouro(III) está preenchida com *bis*(tiossemicarbazonas) coordenadas de modo tetradentado. Neste caso, além de **2** e **3** serem complexos possivelmente mais estáveis, nesses compostos o íon metálico não está coordenado a ligantes lábeis, podendo dificultar assim sua interação com alvos biológicos.

Capítulo 7. Discussão e Conclusões

O presente trabalho consistiu na investigação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas, *bis*(tiossemicarbazonas) e seus complexos metálicos. Foram investigadas as atividades antimicrobiana e citotóxica contra células tumorais humanas.

A inibição da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), envolvida na biossíntese do ADN, na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, é considerada um dos principais alvos de ação das tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas¹. Gálio(III), por suas similaridades químicas com ferro(III), poderia substituir o ferro na subunidade R2 da RDR, com a conseqüente inativação da enzima². Assim, complexos de gálio(III) com tiossemicarbazonas reuniriam, em um mesmo composto, ambos o metal e o ligante com mecanismo de ação via inibição de RDR.

A tiorredoxina redutase (TrxR) é uma enzima que está envolvida no mesmo ciclo de reações redox do qual a RDR faz parte e que resulta na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Sabe-se que compostos de ouro(I) agem como inibidores de TrxR e que essa inibição seria parte de seus mecanismos de ação antitumoral³.

Assim, no planejamento de agentes citotóxicos contra células tumorais a partir de tiossemicarbazonas, os íons metálicos de escolha foram gálio(III) e ouro(I). Nos complexos desses metais, ambos o ligante e o metal teriam atividade intrínseca. Tiossemicarbazona e gálio(III) teriam como alvo a RDR, enquanto o alvo de ouro(I) seria a TrxR. Em todos os casos a interferência com a biossíntese do ADN seria o mecanismo final.

Para um estudo do efeito da substituição sobre as atividades antimicrobiana e citotóxica do composto α (N)-heterocíclico *N*(4)-fenil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph, **1**), foram preparados seus derivados com os substituintes flúor, cloro, iodo e nitro nas posições *orto*-, *meta*- e *para* do grupo *N*(4)-fenil: H2Ac4*o*FPh (**2**), H2Ac4*m*FPh (**3**), H2Ac4*p*FPh (**4**), H2Ac4*o*ClPh (**5**), H2Ac4*m*ClPh (**6**), H2Ac4*p*ClPh (**7**), H2Ac4*o*IPh (**8**), H2Ac4*m*IPh (**9**), H2Ac4*p*IPh (**10**), H2Ac4*o*NO₂Ph (**11**), H2Ac4*m*NO₂Ph (**12**) e H2Ac4*p*NO₂Ph (**13**).

A maioria dos compostos substituídos foi mais ou tão ativa quanto **1** contra *S. aureus*. Todas as tiossemicarbazonas foram mais ativas do que fluconazol contra *C. albicans*, sendo os compostos **9-13** mais ativos do que **1**. Portanto, a substituição em *N*(4)-fenil resultou em aumento da atividade antimicrobiana em alguns casos. Entretanto não foi possível estabelecer uma relação entre estrutura e atividade.

As tiossemicarbazonas **1-13** foram ativas em doses nanomolares contra linhagens de células tumorais U87 (glioma que expressa a proteína pró-apoptótica p53), T98G (glioma que expressa a proteína p53 mutante) e MCF-7 (carcinoma mamário), apresentando atividade até

¹ J. Shao, B. Zhou, A.J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, Mol. Cancer Ther. 5 (2006) 586.

² C.R. Chitambar, S.A. Zahir, P.S. Ritch, T. Anderson, Am. J. Clin.Oncol. 20 (1997) 173.

³ A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1692.

cem vezes superior à do controle etoposídeo. As tiossemicarbazonas mostraram baixa atividade hemolítica ($CI_{50} > 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), sugerindo que o rompimento da membrana celular não é o mecanismo pelo qual as tiossemicarbazonas induzem morte das células. A baixa toxicidade às hemácias também sugere que os compostos apresentam bom índice terapêutico, de forma que poderiam ser considerados bons candidatos a protótipos de fármacos antitumorais.

De acordo com cálculos computacionais e com estudos de relação estrutura-atividade, a atividade citotóxica de **1-13** está diretamente correlacionada com a energia do orbital HOMO e com a carga parcial do enxofre, e inversamente correlacionada com a área da superfície molecular. Esta última correlação está de acordo com a observação de isômeros *orto* serem mais citotóxicos do que seus isômeros de posição *meta* e *para*.

As tiossemicarbazonas foram ativas em ambas as linhagens de gliomas T98G e U87, sugerindo que seu mecanismo de ação pode ocorrer por vias que independem da proteína pró-apoptótica p53. De acordo com o ensaio de coloração simultânea com brometo de etídio e laranja de acridina, as células expostas a **1-13** sofrem morte celular por apoptose e autofagia. Uma vez que as tiossemicarbazonas **1-13** induzem apoptose, investigamos se o mecanismo apoptótico estaria relacionado à inibição da polimerização da tubulina e/ou ao comprometimento da estabilização dos microtúbulos. A tiossemicarbazona H2Ac4pCℓPh (**7**) inibiu parcialmente a polimerização da tubulina em concentrações micromolares e induziu a desorganização de microtúbulos, porém não causou a interrupção do processo mitótico. Consequentemente, a interação direta com microtúbulos provavelmente não é o principal mecanismo de indução de apoptose das tiossemicarbazonas.

Foram então obtidos complexos de gálio(III) com as 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas *N*(4)-*para* substituídas *N*(4)-*para*-fluorfenil- (H2Ac4pFPh), *N*(4)-*para*-clorofenil- (H2Ac4pCℓPh), *N*(4)-*para*-iodofenil- (H2Ac4pIPh), *N*(4)-*para*-nitrofenil- (H2Ac4pNO₂Ph) 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e *N*(4)-*para*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4pT). Esses complexos foram testados quanto à sua atividade citotóxica frente a células tumorais humanas. Uma vez que gálio(III) apresenta também ação antimicrobiana, provavelmente por meio de interação com a RDR dos microorganismos, a ação dos complexos foi também avaliada contra fungos e bactérias.

Os complexos [Ga(2Ac4pFPh)₂]NO₃, [Ga(2Ac4pCℓPh)₂]NO₃, [Ga(2Ac4pIPh)₂]NO₃ (**3**), [Ga(2Ac4pNO₂Ph)₂]NO₃·3H₂O e [Ga(2Ac4pT)₂]NO₃ têm fórmula geral [Ga(L)₂]NO₃, onde (L = tiossemicarbazona desprotonada). Os dados cristalográficos obtidos para os complexos [Ga(2Ac4pFPh)₂]NO₃·DMSO e [Ga(2Ac4pT)₂]NO₃·DMSO indicam a presença de um centro de gálio(III) hexacoordenado a duas tiossemicarbazonas aniônicas coordenadas pelo sistema N_{py}-N-S.

A coordenação a gálio(III) não aumentou a ação das tiossemicarbazonas frente a *S. aureus*. Por outro lado, os complexos foram mais ativos contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* do que as tiossemicarbazonas livres. O efeito da complexação sobre a atividade dos compostos foi mais pronunciado contra *P. aeruginosa*.

Os efeitos adversos resultantes da administração de cloridrato de tetraciclina e fluconazol, bem como o surgimento de resistência microbiana aos fármacos impulsionam a investigação de novos compostos antimicrobianos. Neste sentido, os complexos de gálio(III) seriam interessantes candidatos a fármacos, uma vez que estes apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* similar aos fármacos utilizados como controle. Por outro lado, o nitrato de gálio não é ativo contra as cepas. Possivelmente seu caráter hidrofílico dificulta a absorção de gálio(III) pelo sistema microbiano. Provavelmente a complexação possibilitou a captação de gálio(III) por bactérias e fungos, resultando em aumento da atividade antimicrobiana. A coordenação a gálio(III) constituiu, assim, uma estratégia interessante de redução de doses contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Os complexos de gálio não se revelaram mais potentes do que suas tiossemicarbazonas contra células T98G, U87 e MCF-7 e apresentaram baixa atividade hemolítica ($CI_{50} > 10^{-5}$ mol L^{-1}), sugerindo que o rompimento da membrana celular não é o mecanismo pelo qual estes induzem morte das células.

A reação entre $H AuCl_4$ e 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H_2Ac_4DH), seus derivados *N*(4)-metil- (H_2Ac_4Me) e *N*(4)-fenil- (H_2Ac_4Ph) substituídos e de *N*(4)-fenil-2-benzoilpiridina (H_2Bz_4Ph) tiossemicarbazona levou à redução de ouro(III) a ouro(I) com a formação dos complexos: $[Au(H_2Ac_4DH)Cl] \cdot CH_3OH$, $[Au(H_2Ac_4Me)Cl]Cl$, $[Au(H_2Ac_4Ph)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ e $[Au(H_2Bz_4Ph)Cl]Cl$. Nestes compostos, as tiossemicarbazonas se encontram coordenadas a ouro(I) apenas pelo átomo de enxofre.

Uma vez que durante a reação de síntese dos complexos de ouro ocorreu a redução de ouro(III) para ouro(I), é possível que as tiossemicarbazonas tenham reduzido o íon ouro(III), considerando-se que essas moléculas exibem propriedades redutoras. Entretanto, como os complexos foram obtidos com bons rendimentos, é provável que também tenha ocorrido redução de ouro(III) com a oxidação de metanol durante a síntese.

Nos complexos $[Au(H_2Ac_4Me)Cl]Cl$, $[Au(H_2Ac_4Ph)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ e $[Au(H_2Bz_4Ph)Cl]Cl$, as tiossemicarbazonas estão protonadas pelo nitrogênio heteroaromático. Uma vez que a piridina é uma base fraca, o próton do grupo piridínium ($N_{py}-H$) poderia ser facilmente liberado em solução. Assim, as formas ativas desses complexos seriam preferencialmente espécies neutras.

Em geral as tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro demonstraram efeitos citotóxicos contra as linhagens de células tumorais HL-60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HCT-116 (carcinoma

colorretal humano). As células leucêmicas Jurkat e HL-60 foram mais sensíveis aos compostos do que as células de tumores sólidos MCF-7 e HCT-116. HAuCl_4 não apresentou atividade contra todas as linhagens. Além disso, a maioria dos compostos foi menos citotóxica às células do sangue PBMC do que auranofina. $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ foi o complexo mais ativo, entretanto, também mostrou-se o mais tóxico às células PBMC. O complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$, por sua vez, foi mais ativo do que $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph}$ contra células HL-60 e Jurkat e menos tóxico às células PBMC do que auranofina.

Todos os compostos induziram mais de 50% de fragmentação do ADN de células Jurkat e HL-60, sugerindo que a indução de apoptose pareceria ser um mecanismo de ação dos compostos contra essas células.

O complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ e o fármaco auranofina apresentaram efeitos citotóxicos contra células MCF-7 e induziram apenas cerca de 20 % de fragmentação de ADN nessas células. Assim, fragmentação de ADN provavelmente não é o principal mecanismo de ação dos compostos em células MCF-7.

O complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ promoveu 100 % de fragmentação do ADN de células HCT-116, enquanto que auranofina promoveu apenas 35% da fragmentação. Entretanto, a auranofina foi significativamente mais ativa do que $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ contra essa linhagem. Os resultados sugerem que a fragmentação de ADN é o principal modo de ação do complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ mas não da auranofina contra células HCT-116.

Uma vez que não apenas o complexo de ouro $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ e a auranofina, como também HAuCl_4 revelaram-se fortes inibidores da atividade enzimática de TrxR, o efeito inibitório de TrxR está relacionado à presença do íon metálico. No entanto, embora HAuCl_4 iniba a atividade de TrxR, este composto não exibiu atividade citotóxica contra as linhagens HL-60, Jurkat, MCF-7 e HCT-116. O caráter hidrofílico de HAuCl_4 provavelmente impede sua passagem pela membrana celular. Diferente de HAuCl_4 , o complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ não apenas inibiu a atividade de TrxR, como também apresentou efeitos citotóxicos, sugerindo que a tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me}$, além de seu efeito citotóxico intrínseco, também atuou como carreador do íon ouro(I) para o interior das células. É possível que o efeito citotóxico do complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ possa ser mediado por ambos o íon ouro(I) e a tiossemicarbazona, ocorrendo uma dissociação do complexo. Assim, $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ poderia conter duas entidades as quais atuariam sobre diferentes alvos em um mesmo composto: a tiossemicarbazona, cujo alvo biológico é a RDR e o íon ouro(I), que atuaria sobre a TrxR.

A literatura reporta vários trabalhos a respeito de complexos de ouro que apresentam atividade inibitória sobre TrxR, demonstrando a relevância desta enzima na farmacologia de compostos à base de ouro. Devido às suas propriedades antioxidantes, o sistema tiorredoxina previne as células de estresse oxidativo, o qual pode causar danos ao ADN, por exemplo. A

superexpressão de TrxR tem sido observada em várias linhagens de células tumorais. Além disso, a presença de elevados níveis do substrato tioredoxina tem sido associada à resistência à cisplatina. Portanto, TrxR é um alvo interessante a ser considerado para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer⁴.

Tem sido observado que a indução de apoptose por auranofina em células Jurkat parece ser mediada pela inibição de TrxR mitocondrial e citosólica, sendo acompanhada por aumento do nível de peróxido de hidrogênio⁴. A capacidade do complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ de atuar como inibidor de TrxR sugere que esta enzima mitocondrial é seu potencial alvo celular, e assim o distúrbio da função mitocondrial poderia ser um potencial mecanismo de morte celular. Desse modo, embora tenhamos observado que o complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ não interage diretamente com o ADN, nem promove sua clivagem, a fragmentação de ADN nas células tumorais Jurkat, HL-60 e HCT-116 foi em parte resultado da capacidade do complexo de inibir a TrxR. A inibição dessa enzima pode desencadear o mau funcionamento da mitocôndria, eventualmente levando à morte por apoptose.

Uma vez que foi observada fragmentação de apenas 20% do ADN em células MCF-7 na presença do complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$, nesse caso provavelmente a enzima TrxR não é o principal alvo para a ação citotóxica de desse complexo.

Todos os complexos de ouro com tiossemicarbazonas derivadas de piridina apresentaram um perfil pró-apoptótico, estes poderiam ser considerados potenciais “agentes antimitocondriais”. Vale salientar que outros estudos deverão ser realizados para confirmar esta proposição, tais como a investigação (a) dos efeitos do complexo sobre o potencial e a permeabilidade da membrana mitocondrial, (b) do acúmulo de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria e (c) da expressão de proteínas associadas com a inibição da função mitocondrial.

A reação entre HAuCl_4 e glicoxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) ($\text{H}_2\text{Gy3DH}$) e seus derivados *N*(3)-metil ($\text{H}_2\text{Gy3Me}$) e *N*(3)-etil ($\text{H}_2\text{Gy3Et}$) substituídos levou à formação dos complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$, $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$.

O íon ouro(III) foi reduzido durante a síntese do complexo $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$, enquanto que o mesmo não foi observado para os complexos $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$. Assim, foi investigado o comportamento eletroquímico das *bis*(tiossemicarbazonas). Não foi possível relacionar o potencial de oxidação das *bis*(tiossemicarbazonas) com suas potenciais capacidades em reduzir ouro(III) e assim justificar a presença de ouro(I) em apenas um dos três complexos. Por outro lado, os estudos permitiram diferenciar os estado de oxidação do íon ouro em todos os complexos.

Em geral a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, as *bis*(tiossemicarbazonas) e seus complexos de ouro demonstraram efeitos citotóxicos contra as linhagens de células tumorais, exceto contra HCT-116. As células leucêmicas Jurkat e HL-60 foram as mais sensíveis aos compostos.

⁴ A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1692.

Todos os complexos de ouro foram tão citotóxicos contra células Jurkat quanto auranofina, porém foram menos ativos contra células MCF-7 e HCT-116 do que este fármaco.

$\text{H}_2\text{Gy3Me}$, $\text{H}_2\text{Gy3Et}$ e seus complexos de ouro(III) $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ foram mais ativos do que a cisplatina contra as células MCF-7. Além disso, nesse caso, a complexação a ouro(III) resultou em aumento da atividade citotóxica.

O complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ inibiu a atividade enzimática TrxR. A concentração necessária para inibir em 50% a atividade da enzima (CI_{50}) foi $2,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ sugerindo que TrxR é um possível alvo biológico para a ação citotóxica do complexo. Assim, o complexo $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ inibiu a atividade de TrxR e apresentou efeitos citotóxicos, sugerindo que a *bis*(tiossemicarbazona) $\text{H}_2\text{Gy3Me}$, além de seu efeito citotóxico intrínseco, também atuou como carreador de íon ouro(I) para o interior das células.

Entretanto, diferente do comportamento apresentado pelos complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de piridina, em geral não foi observado aumento ou houve aumento pouco expressivo da atividade citotóxica dos complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$, $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ em relação às *bis*(tiossemicarbazonas) livres. Nos complexos de ouro(I) com mono tiossemicarbazonas, o íon metálico está coordenado a um cloreto (ligante lábil) e à tiossemicarbazona monodentada pelo átomo de enxofre. Dessa forma foi sugerido que ocorreria a dissociação desses complexos no meio celular, levando à atuação do íon metálico e das tiossemicarbazonas sobre diferentes alvos.

No entanto, provavelmente para os complexos $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$, $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ a coordenação das *bis*(tiossemicarbazonas) ao íon metálico levou à formação de compostos mais estáveis. No caso do complexo $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{Gy3DH})_2]\text{Cl}_2$, o íon ouro(I) está coordenado a dois átomos de enxofre, cuja ligação possivelmente é mais forte do que a ligação Au-Cl. Para os complexos $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$, a esfera de coordenação dos íons ouro(III) está preenchida com *bis*(tiossemicarbazonas) coordenadas de modo tetradentado. Neste caso, além de $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Me})]\text{Cl}_3$ e $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Gy3Et})]\text{Cl}_3$ serem complexos possivelmente mais estáveis, nesses compostos o íon metálico não está coordenado a ligantes lábeis, podendo dificultar assim sua interação com alvos biológicos.

Compostos de bismuto(III) são empregados na clínica para tratar doenças do trato gastro-intestinal, principalmente infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*, mas apresentam atividade contra outros microorganismos⁵. Considerando-se que a resistência aos antibióticos em uso clínico consiste em um dos grandes problemas de saúde humana e animal nos dias de hoje, torna-se importante a busca por novos agentes antimicrobianos.

Compostos antimoniais são empregados contra leishmanioses, mas apresentam efeitos

⁵ G.G. Briand, N. Burford, Chem. Rev. 99 (1999) 2601

colaterais indesejáveis, sendo necessária a busca por alternativas terapêuticas⁶. Uma vez que *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, apresenta similaridades bioquímicas com *Leishmania*, compostos de antimônio poderiam também ser úteis como agentes antichagásicos. Além disso, a literatura relata que compostos de antimônio mostram atividade contra diferentes microorganismos, e portanto apresentam potencial como novos candidatos a fármacos antimicrobianos⁷.

Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) foram obtidos com tiossemicarbazonas. Ambos os íons metálicos apresentam o mesmo comportamento estrutural em seus complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂], [Bi(2Fo4Ph)Cl₂], [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂] com *N*(4)-fenil-2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4Ph) e *N*(4)-fenil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona (H2Ac4Ph). Estruturas cristalográficas dos complexos [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]·2DMSO, [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] e [Bi(2Ac4Ph)Cl₂(DMSO)] indicam que antimônio(III) e bismuto(III) estão coordenados às tiossemicarbazonas pelo sistema N_{py}-N-S e a dois cloretos.

Diferenças são observadas na ação antibacteriana antimônio(III) e bismuto(III) contra bactérias *S. aureus*. Complexos de antimônio(III) foram até três vezes mais ativos contra *S. aureus* do que H2Fo4Ph e H2Ac4Ph, enquanto que complexos de bismuto(III) foram até 60 vezes mais ativos do que as tiossemicarbazonas livres. O tipo do íon metálico presente na estrutura dos complexos, portanto, foi determinante para a redução de dose contra *S. aureus*.

Assim como a coordenação a bismuto(III) resultou em compostos mais ativos contra *S. aureus*, o mesmo efeito foi verificado no estudo da atividade dos compostos contra *S. epidermidis* e *E. faecalis*. Foram observadas diferentes sensibilidades das bactérias aos complexos metálicos. Em ordem crescente de sensibilidade aos complexos de bismuto(III), temos: *S. aureus* > *E. faecalis* > *S. epidermidis*. No entanto, se verifica que em geral os complexos apresentaram valores similares de CIM em uma mesma cepa, apesar desses compostos provavelmente apresentarem diferentes lipofilias. Possivelmente, a capacidade das tiossemicarbazonas em coordenar ao bismuto(III) e assim funcionar como carreadoras do íon metálico para o sistema microbiano seja o fator relevante para promover o aumento da atividade antibacteriana. A coordenação a bismuto(III) constituiu, portanto, uma estratégia interessante de redução de doses contra as bactérias *gram*-positivas, enquanto que o mesmo não foi observado para bactérias *gram*-negativas. O estudo sugere que o íon metálico exerce um papel importante na atividade antimicrobiana dos compostos.

Foi investigada a ação de tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) sobre as formas epimastigota e tripomastigota do protozoário *Trypanosoma cruzi*. Tiossemicarbazonas e seus complexos de antimônio(III) apresentaram atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, porém apresentaram alta citotoxicidade em células saudáveis.

⁶ C. Demicheli, F. Frézard, Cadernos temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 24.

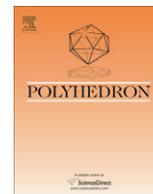
⁷ N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomyia, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176

No capítulo 6 foram relatada a obtenção de complexos de bismuto(III) com glioxaldeído *bis*(tiossemicarbazona) (H_2Gy3DH) e seus derivados *N*(3)-etil (H_2Gy3Et) e *N*(3)-fenil (H_2Gy3Ph) substituídos. Dentre as duas técnicas de caracterização em solução utilizadas RMN e espectroscopia eletrônica, esta última permitiu observar diferença significativa entre o perfil espectral de *bis*(tiossemicarbazonas) e dos complexos de bismuto(III), confirmando assim que ocorreu a complexação.

As *bis*(tiossemicarbazonas) não são ativas ou apresentam baixa atividade antimicrobiana. A coordenação a bismuto(III) faz aumentar significativamente a ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. faecalis*. A coordenação a bismuto(III) com *bis*(tiossemicarbazonas), da mesma forma que com tiossemicarbazonas derivadas de piridinas, constituiu uma estratégia interessante de redução de doses contra *S. aureus* e *E. faecalis*. Uma vez que sais de bismuto(III) são muito insolúveis, a coordenação com tiossemicarbazonas ou *bis*(tiossemicarbazonas) consiste em uma boa estratégia para aumentar a solubilidade e facilitar a incorporação do metal.

No presente trabalho foram obtidos novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos derivados de tiossemicarbazonas, com ação antitumoral e antimicrobiana. Estudos de mecanismos de ação citotóxica em células tumorais humanas foram realizados, os quais contribuíram para um melhor entendimento do modo de ação dos compostos estudados. Alguns dos compostos foram ativos contra células de tumores humanos em doses nanomolares e apresentaram inferior toxicidade sobre células saudáveis. Em muitos casos a coordenação aos metais revelou-se uma boa estratégia de redução de doses, tanto no caso dos compostos com atividade antitumoral quanto no caso de compostos com ação antimicrobiana. Este trabalho contribuiu de forma significativa para a compreensão dos mecanismos de ação de tiossemicarbazonas e demonstrou a eficácia da complexação a metais como estratégia de aumento de atividade farmacológica dos compostos estudados, demonstrando a importância da Química Medicinal Inorgânica para o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos.

ANEXOS



Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity

Josane A. Lessa^a, Débora C. Reis^a, Isolda C. Mendes^b, Nivaldo L. Speziali^c, Lucas F. Rocha^d, Valéria R.A. Pereira^d, Cristiane M.L. Melo^d, Heloisa Beraldo^{a,*}

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

^b Escola de Belas Artes, Departamento de Artes Plásticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2010

Accepted 4 November 2010

Available online 16 November 2010

Keywords:

Thiosemicarbazone

Antimony(III) complexes

Antitrypanosomal activity

ABSTRACT

The antimony(III) complexes [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**), [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**) were prepared with *N*(4)-phenyl-2-formyl- (H₂Fo4Ph), 2-acetyl- (H₂Ac4Ph) and 2-benzoylpyridine (H₂Bz4Ph) thiosemicarbazones. The antimony(III) complexes presented antitrypanosomal activity against the epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Complexes (**1**) and (**2**) exhibited higher activity than the reference drugs benznidazole and nifurtimox.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic diseases affect hundreds of millions people around the world, mainly in underdeveloped countries. Since parasitic protozoa are eukaryotic, they share many common features with their mammalian host making the development of selective drugs a hard task. Diseases caused by *Trypanosomatidae*, which share a similar state regarding drug treatment, include Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*) and leishmaniasis (*Leishmania* spp.). These trypanosomatids are responsible for an infected population of nearly 30 million and more than 400 million are at risk [1]. Chagas disease, or American Trypanosomiasis, remains the major parasitic disease burden in Latin America, despite recent advances in the control of its vectorial and transfusional transmission [2].

T. cruzi presents three main morphological forms. The epimastigote form replicates within the crop and midgut of Chagas' disease vectors as it is released with the insect excrements as the non-dividing highly infective trypomastigotes that invade mammalian tissues via wounds caused by blood sucking action. The parasite multiplies intracellularly as the amastigote form which is released as the non-dividing bloodstream trypomastigote form that invades other tissues [1].

Drugs currently used in the treatment of Chagas' disease are two nitroaromatic heterocycles, nifurtimox (nfx, Lampit[®]) and

benznidazole (bnz, Rochagan[®], Roche), introduced empirically over three decades ago [2]. These drugs have demonstrated several limitations in their use due to their low bioavailability and their limited efficacy in the different stages of the disease as well as the development of parasite resistance [3].

The pentavalent organoantimonials, meglumine antimoniate (antimony(V) *N*-methyl-glucamine) and sodium stibogluconate (sodium antimony(V) gluconate), are commonly used for the treatment of leishmaniasis. The mechanism of action of the antimonial drugs is not completely understood. It is possible that Sb(V) behaves as a prodrug which is probably reduced *in vivo* into Sb(III) by cellular thiols and/or specific enzymes [4]. In principle antimony compounds could also constitute new antitrypanosomal drugs candidates.

Thiosemicarbazones are an interesting class of compounds with a wide range of pharmacological applications [5] and have been identified as lead scaffolds of cruzain inhibitors [6,7]. Cruzain was shown to be one of the most relevant proteases in *T. cruzi* [7]. In many circumstances the pharmacological action of thiosemicarbazones increases upon coordination to metal ions [8–10]. We demonstrated that nitro-thiosemicarbazones and their copper(II) [11] and ruthenium(II) [12] complexes present significant *in vitro* anti-trypanosomal activity, the complexes being at least 5–25 times more active than the free ligands.

We recently started an investigation on the pharmacological profile of antimony(III) complexes with thiosemicarbazones and showed that these complexes exhibit high cytotoxicity against human leukemia cell lines [13].

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5740; fax: +55 31 3409 5700.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

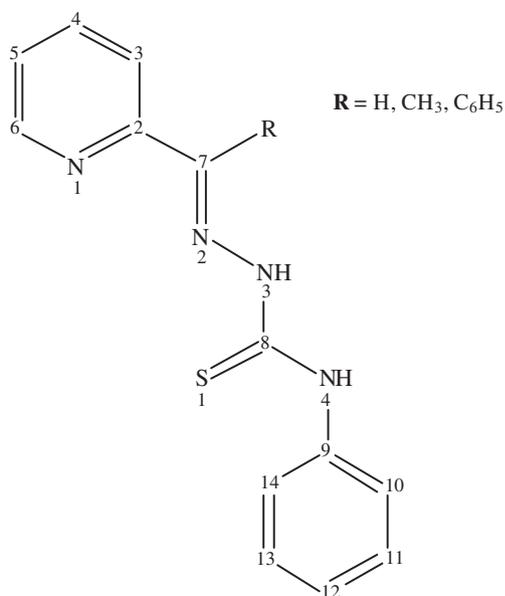


Fig. 1. Generic representation for *N*(4)-phenyl-2-pyridine-derived thiosemicarbazones.

In the present work, antimony(III) complexes of *N*(4)-phenyl-2-formyl- ($\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}$), 2-acetyl- ($\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$) and 2-benzoylpyridine ($\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph}$) thiosemicarbazones (Fig. 1) were assayed against *T. cruzi* strains. The strategy of associating thiosemicarbazones to antimony(III) could lead to new metal-based anti-trypanosomal drugs.

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. The thiosemicarbazones were prepared according to standard procedures [10].

Partial elemental analyses were performed on a Perkin–Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) 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 $\text{DMSO-}d_6$ as the solvent and TMS as internal reference.

2.2. Syntheses of antimony(III) complexes with *N*(4)-phenyl-2-formylpyridine thiosemicarbazone ($\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}$), *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone ($\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$) and *N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone ($\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph}$)

The antimony(III) complexes were obtained by mixing an ethanol solution (20 mL) of the desired thiosemicarbazone (1 mmol) with antimony chloride in 1:1 ligand-to-metal molar ratio at room temperature with stirring for 3.5 h. The resulting solids were filtered, washed with ethanol followed by diethyl ether, and dried *in vacuo*.

2.2.1. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-formylpyridinethiosemicarbazonato)-antimony(III) [$\text{Sb}(\text{2Fo}_4\text{Ph})_2(\text{Cl})_2$] (**1**)

Yellow solid. *Anal. Calc.* for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SSb}$: C, 34.85; H, 2.47; N, 12.51. Found: C, 34.44; H, 2.38; N, 12.43%. FW: 447.98 g mol^{-1} . IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3281m, $\nu(\text{C=N})$ 1611s, $\nu(\text{C=S})$ 730m, $\rho(\text{py})$ 622w. IR (CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{Sb-N}_{\text{azometh.}})$ 453m, $\nu(\text{Sb-S})$ 432m,

$\nu(\text{Sb-N}_{\text{py}})$ 225w, $\nu(\text{Sb-Cl})$ 344m. $^1\text{H NMR}$ [200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ (ppm)] main signals: 10.40 [s, 1H, N(4)H]; 9.09 [d, 1H, H(6)]; 8.09 [d, 1H, H(3)]; 8.31 [t, 1H, H(4)]; 9.16 [s, 1H, H(7)]; 7.11 [t, 1H, H(5)]. $^{13}\text{C NMR}$ [200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ (ppm)] main signals: 169.12 [C(8)=S]; 151.49 [C(2)]; 147.76 [C(6)]; 140.60 [C(4)]; 141.25 [C(9)]; 145.65 [C(7)=N]; 123.70 [C(5)]; 121.80 [C(3)]. $A_M = 20.15\ \Omega^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 251.9–252.4 °C. Yield 82%.

2.2.2. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-acetylpyridinethiosemicarbazonato)-antimony(III) [$\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})_2(\text{Cl})_2$] (**2**)

Orange solid. *Anal. Calc.* for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SSb}$: C, 36.40; H, 2.84; N, 12.13. Found: C, 36.20; H, 2.80; N, 12.20%. FW: 461.99 g mol^{-1} . IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3245m, $\nu(\text{C=N})$ 1596s, $\nu(\text{C=S})$ 753m, $\rho(\text{py})$ 602w. IR (CsI/nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{Sb-N}_{\text{azometh.}})$ 505m, $\nu(\text{Sb-S})$ 430m, $\nu(\text{Sb-N}_{\text{py}})$ 222w, $\nu(\text{Sb-Cl})$ 327m. $^1\text{H NMR}$ [200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ (ppm)] main signals: 10.39 [s, 1H, N(4)H]; 9.09 [d, 1H, H(6)]; 8.80–8.60 [d, 1H, H(3)]; 8.00–7.50 [t, 1H, H(4)]; 2.81 [s, 3H, H(15)]; 7.11 [t, 1H, H(5)]. $^{13}\text{C NMR}$ [200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ (ppm)] main signals: 167.89 [C(8)=S]; 151.93 [C(2)]; 144.84 [C(6)]; 144.47 [C(7)=N]; 142.22 [C(4)]; 120.85 [C(3)]; 139.77 [C(9)]; 123.53 [C(5)]; 16.93 [C(15)]. $A_M = 22.79\ \Omega^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ in DMF. Melting point: 237.9–238.8 °C. Yield 95%.

2.2.3. Dichloro(*N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridinethiosemicarbazonato)-antimony(III) [$\text{Sb}(\text{2Bz}_4\text{Ph})_2(\text{Cl})_2$] (**3**)

Complex (**3**) was obtained as previously described Ref. [13].

2.3. Crystallography

Crystals of $\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph-HCl}$ and complexes (**1a**) and (**2**) suitable for X-ray diffraction were mounted on a glass fiber. Data were collected at room temperature on an Oxford-Diffraction GEMINI diffractometer. Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structures were solved by direct methods and refined on F^2 by full-matrix least-squares using the SHELX-97 [14,15] program in a WinGX system [16]. All hydrogen atoms of $\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph-HCl}$ could be identified in the Fourier difference map and the refinement results were in good agreement with the expected values. Hence the hydrogen atoms bonded to nitrogens were isotropically refined. Although some of the hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map in the structures of the complexes, in the final model they were geometrically positioned and refined using a riding model. All non-H atoms were refined anisotropically. Molecular graphics and packing figures were obtained from Ortep [17] and Mercury [18], respectively.

2.4. Cytotoxicity and antitrypanosomal activity

2.4.1. Animals

Male BALB/c mice (6–8 weeks old) were raised at the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained at the animal facilities of the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil. All mice were sacrificed and treated in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation Commission for Experiments with Laboratory Animals (Ministry of Health, Brazil, 0266/05).

2.4.2. Obtaining spleen cells

Spleen cells were obtained according to the literature [19]. After euthanizing the animal with CO_2 gas, the spleen of each mouse was removed aseptically and placed in Falcon tubes containing RPMI 1640 with 10% of fetal calf serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a Petri dish where they were macerated. The obtained cell suspensions were transferred to Falcon tubes containing approximately 10 mL of incomplete medium,

centrifuged at 4 °C, 200g for 5 min. After discarding the supernatant, distilled water was added to the sediment to promote lysis of red blood cells. The supernatant, containing no cellular debris was collected and centrifuged at 4 °C, 200g for 5 min. The sediment (containing cells) was resuspended in complete RPMI 1640. An aliquot of each cell suspension was separated, diluted in trypan blue to be quantified in a Neubauer chamber and the cell viability was determined.

2.4.3. *In vitro* cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds was determined using BALB/c mice splenocytes (6×10^5 cells well⁻¹) cultured in 96-well plates in RPMI 1640 media (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 50 µg mL⁻¹ of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil). Each compound was evaluated in six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 µg mL⁻¹), in triplicate on two independent assays. Cultures were incubated in the presence of ³H-thymidine (Amersham Biosciences) (1 µCi well⁻¹) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After this period, the content of the plate was harvested to determine the ³H-thymidine ([³H]TdR) incorporation using a beta-radiation counter (β-matrix 9600, Packard). The cytotoxicity of the compounds was determined by comparing the percentage of ³H-thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) of imidazolidines-treated wells in relation to untreated wells. Non-cytotoxic concentrations were defined as those causing a reduction of ³H-thymidine incorporation below 30% in relation to untreated controls.

2.4.4. *T. cruzi* assays

Epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) were cultivated at 26 °C in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% hemin, 1% R9 medium and 50 µg mL⁻¹ gentamycin. Parasites (10⁶ mL⁻¹) were cultured in a fresh medium in the absence or in the presence of the compounds being tested (from stock solution in dimethylsulfoxide, DMSO). Cell growth was determined after 11 days of culture by counting viable forms in a hemacytometer, in triplicate. The compounds used were from a stock solution in DMSO. To determine the IC₅₀, cultures of Y strain epimastigotes in the presence of different concentrations of the compounds were evaluated after 11 days as described above. IC₅₀ calculation was carried out using non-linear regression on PRISM 4.0 GRAPHPAD software. Y strain *T. cruzi* trypomastigotes were obtained from culture supernatants of Vero cell line at 37 °C and placed in 96-well plates (4×10^5 well⁻¹) in a RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 50 µg mL⁻¹ gentamycin. Viable parasites were counted in a hemacytometer 24 h after addition of complexes by way of trypan blue exclusion. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the antimony(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂] (**1**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**), in which an anionic thiosemicarbazone is attached to the metal center together with two chloride ions.

3.2. Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to ν(C=N) at 1596 and 1588 cm⁻¹ in the infrared spectra of H2Fo4Ph and H2Ac4Ph, respectively, shift to 1611 and 1596 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1**) and (**2**), in agreement with coordination of the imine nitrogen [13,20–22].

The ν(CS) absorption observed at 774 and 802 cm⁻¹ in the spectra of the free thiosemicarbazones shifts to 730 and 753 cm⁻¹ in the spectra of **1** and **2**, indicating coordination of the sulfur. The 30–50 cm⁻¹ shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [13,20–23]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 600 and 584 cm⁻¹ in the spectra of H2Fo4Ph and H2Ac4Ph, respectively, shifts to 622 and 602 cm⁻¹ in complexes (**1**) and (**2**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [13,20–23].

In the spectra of complexes **1** and **2** the absorptions at 453 and 505 cm⁻¹ and the absorptions at 432 and 430 cm⁻¹ were attributed to the ν(Sb–N_{imine}) and ν(Sb–S) vibrations, respectively, and those at 225 and 222 cm⁻¹ to ν(Sb–N_{py}) vibrations [13,20–23]. Therefore in the complexes the thiosemicarbazones are attached to the metal through the N_{py}–N–S chelating system. One absorption attributed to ν(Sb–Cl) at 344 and 327 cm⁻¹ was observed in the spectra of **1** and **2**, respectively [24].

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C and CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signals of all hydrogens and carbons are duplicated in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the thiosemicarbazones, indicating the presence of the *Z* and *E* configurational isomers in solution. In the first N(3)–H is hydrogen bonded to the hetero-aromatic nitrogen while in the second N(3)–H is hydrogen bonded to the solvent [13,20–23]. The signal of N(3)–H at δ 14.43 and 12.04 ppm (H2Fo4Ph) and δ 14.16 and 10.61 ppm (H2Ac4Ph) were attributed to the *Z* and *E* isomers respectively [13,20–23]. The *E* isomer corresponds to 96% and 88% for H2Fo4Ph and H2Ac4Ph, respectively.

In the ¹H and ¹³C NMR spectra of complexes (**1–2**) only one signal was observed for each hydrogen and each carbon. The absence of the N(3)–H signal indicates coordination of an anionic thiosemicarbazone. The signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free bases. Similarly, the signals of C=N, C=S and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination of the thiosemicarbazones through the N_{py}–N–S chelating system (see Fig. 2), with adoption of the *EZ* conformation in relation to the C7–N2 and N3–C8 bonds [13,20–23].

3.3. X-ray diffraction analysis

Crystals of H2Fo4Ph·HCl were obtained from the filtrate in the syntheses of complex (**1**). Crystals of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) were obtained upon dissolution of **1** and **2**, respectively, in DMSO.

Crystals' data, data collection procedures, structures' determination methods and refinement results are summarized in Table 1.

Figs. 3 and 4 are perspective views of H2Fo4Ph·HCl and complexes [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**). Selected intra-molecular bond distances and angles for H2Fo4Ph·HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**), H2Ac4Ph [25], [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] [13] are given in Tables 2 and 3. Molecular structures of H2Ac4Ph and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] have been determined previously [25,13].

The pyridine nitrogen in H2Fo4Ph·HCl is protonated. The cation adopts the *EE* conformation. The molecular packing of H2Fo4Ph·HCl (Fig. 5) reveals that the three N–H...Cl hydrogen bonds give rise to a polymeric structure. The distances and angles observed for H2Fo4Ph·HCl and H2Ac4Ph are very similar (see Tables 2 and 3). H2Ac4Ph adopts the *EE* conformation too, with two weak in-

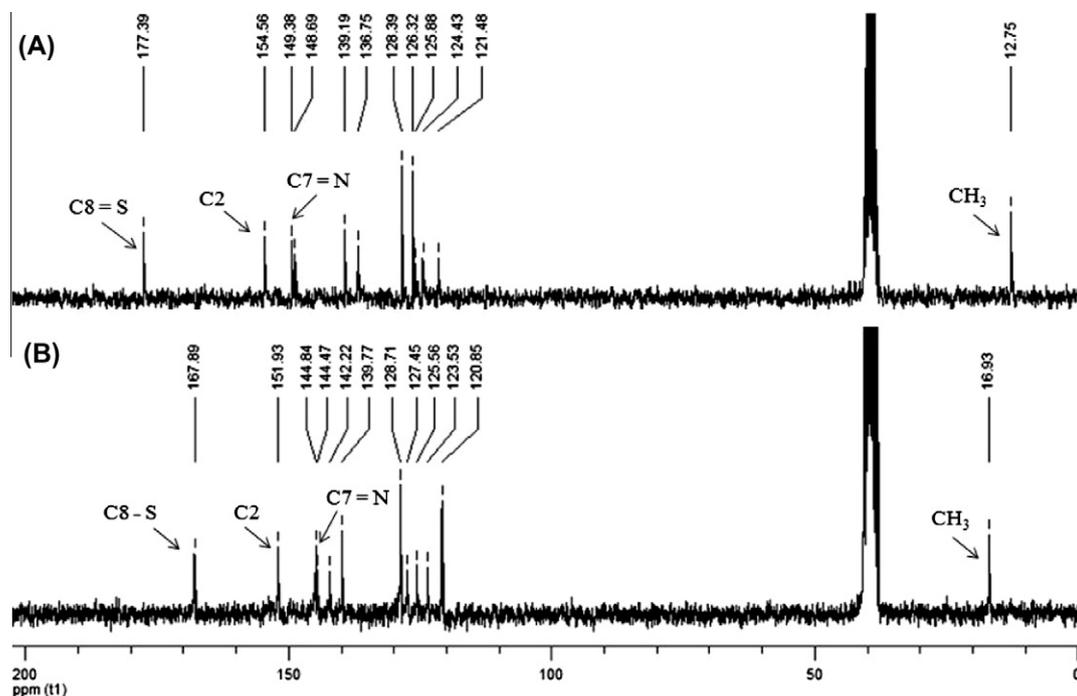


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph}$ (A) and $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**2**) (B).

Table 1

Crystal data and refinement results for $\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}\cdot\text{HCl}$, $[\text{Sb}(\text{2Fo}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]\cdot\text{2DMSO}$ (**1a**) and $[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**2**).

Compound	$\text{H}_2\text{Fo}_4\text{Ph}\cdot\text{HCl}$	$[\text{Sb}(\text{2Fo}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]\cdot\text{2DMSO}$ (1a)	$[\text{Sb}(\text{2Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (2)
Empirical formula	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_3\text{Sb}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SSb}$
Formula weight	292.78	598.18	461.99
T (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	orthorhombic	monoclinic	orthorhombic
Space group	$Pca2(1)$	$P2(1)/c$	$Pbca$
a (Å)	7.6886(2)	12.1753(2)	8.2897(2)
b (Å)	13.9347(4)	21.6284(3)	14.7600(4)
c (Å)	13.0320(3)	9.25140(10)	27.7114(9)
β (°)	90	90.7200(10)	90
V (Å ³)	1396.23(6)	2436.00(6)	3397.66(17)
Z	4	4	8
D_{calc} (Mg/m ³)	1.393	1.631	1.810
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.414	1.629	2.066
$F(000)$	608	1184	1808
Crystal size	$0.19 \times 0.14 \times 0.08$	$0.20 \times 0.14 \times 0.10$	$0.28 \times 0.14 \times 0.10$
θ Range (°)	2.92–26.37	2.90–26.37	2.76–26.37
Index ranges	$-7 \leq h \leq 10$ $-19 \leq k \leq 13$ $-17 \leq l \leq 15$	$-15 \leq h \leq 14$ $-25 \leq k \leq 27$ $-11 \leq l \leq 11$	$-10 \leq h \leq 10$ $-18 \leq k \leq 18$ $-34 \leq l \leq 34$
Reflections collected/unique (R_{int})	5256/2710(0.0200)	26,422/4978(0.0273)	36,227/3477(0.0504)
Data completeness to $\theta = 26.37$	99.9 %	99.9 %	100%
Absorption correction	semi-empirical from equivalents	semi-empirical from equivalents	semi-empirical from equivalents
Data/restraints/parameters	2710/1/184	4978/6/294	3477/0/200
Absolute structure parameter	0.04(5)		
Goodness-of-fit (GOF) on F^2	0.918	1.053	1.002
Final R indices ($I > 2\sigma(I)$)	$R_1 = 0.0256$ $wR_2 = 0.0522$	$R_1 = 0.0223$ $wR_2 = 0.0615$	$R_1 = 0.0265$ $wR_2 = 0.0590$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0346$ $wR_2 = 0.0537$	$R_1 = 0.0314$ $wR_2 = 0.0630$	$R_1 = 0.0424$ $wR_2 = 0.0625$
Largest difference in peak and hole (e Å ⁻³)	0.119 and -0.114	0.427 and -0.299	1.040 and -0.415

ter-molecular $\text{N}(3)\cdots\text{H}\cdots\text{S}(1)$ hydrogen bonds forming a dimer [25].

In complexes (**1a**) and (**2**) Sb(III) is coordinated by a tridentate anionic ligand and two chloride ions in a distorted square pyramidal environment. The $\text{N}(1)\text{--Sb}(1)\text{--S}(1)$ (ca. 145°) and the $\text{Cl}(2)\text{--Sb}(1)\text{--Cl}(1)$ (ca. 162.8°) angles from the base deviate markedly

from the ideal value of 180° in both complexes. The same distortion was found in $[\text{Sb}(\text{2Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (**3**) [13]. Some differences observed for **3** could be due to the different temperatures of measurement, 120 K for **3** and 293 K for complexes (**1a**) and (**2**). However, this difference seems not to significantly modify the results. The distances and angles of all three antimony complexes are

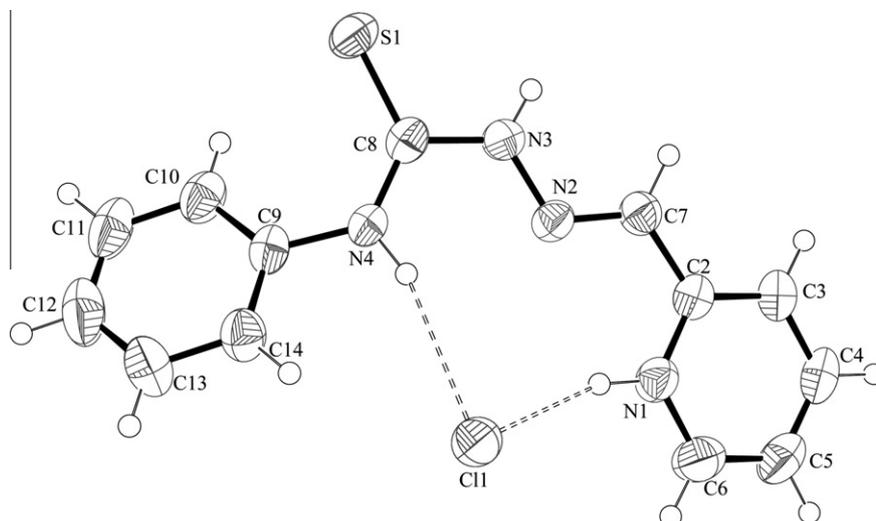


Fig. 3. Molecular plot of H2Fo4Ph-HCl showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

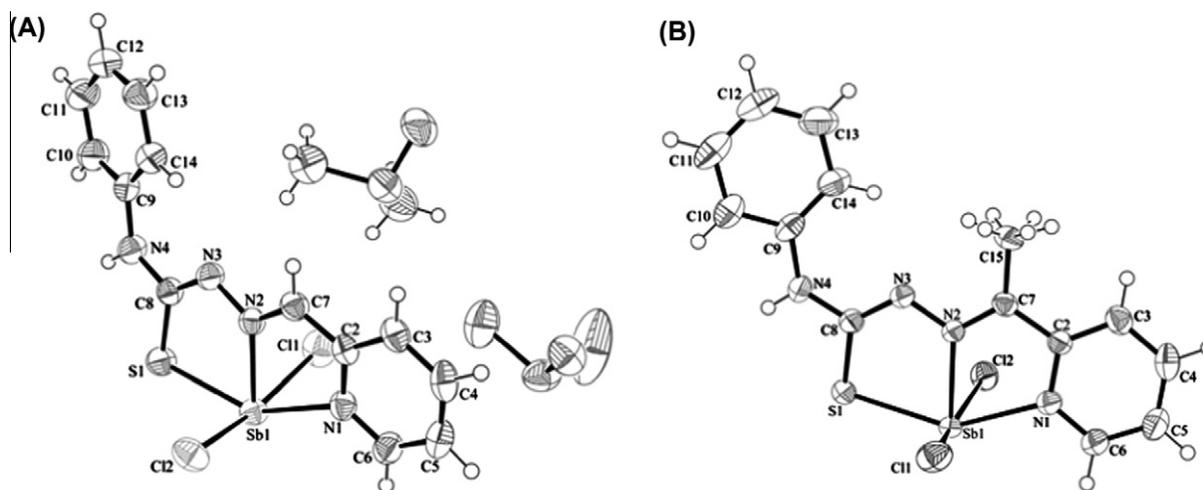


Fig. 4. Molecular plot of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**, A) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**, B) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 2

Selected bond lengths for H2Fo4Ph-HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**), H2Ac4Ph, [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**).

Atoms	Bond lengths (Å)				
	H2Fo4Ph-HCl	[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂].2DMSO (1a)	H2Ac4Ph[25] ^a	[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂][13] (3) ^a
Sb(1)–N(2)		2.247(2)		2.234(2)	2.252(3)
Sb(1)–N(1)		2.502(2)		2.356(3)	2.308(3)
Sb(1)–Cl(1)		2.5788(7)		2.5335(9)	2.5286(12)
Sb(1)–Cl(2)		2.5835(7)		2.6252(9)	2.6114(12)
Sb(1)–S(1)		2.5066(6)		2.5333(8)	2.5733(10)
S(1)–C(8)	1.665(2)	1.741(2)	1.677(2)	1.749(3)	1.725(4)
N(1)–C(6)	1.332(3)	1.324(3)	1.339(3)	1.329(4)	1.330(6)
N(1)–C(2)	1.341(2)	1.347(3)	1.334(2)	1.342(4)	1.341(6)
N(3)–C(8)	1.368(2)	1.318(3)	1.358(3)	1.308(4)	1.311(5)
N(2)–C(7)	1.281(2)	1.288(3)	1.284(3)	1.298(4)	1.301(5)
N(2)–N(3)	1.359(2)	1.371(3)	1.376(2)	1.367(3)	1.368(4)

^a Numbering of some atoms in the published structure was modified in order to make discussion easier.

very similar (see Tables 2 and 3). Fig. 6 shows the weak interactions between Sb(III), N(4)–H and the O atoms of the solvent for [Sb(2Fo4Ph)Cl₂].2DMSO (**1a**).

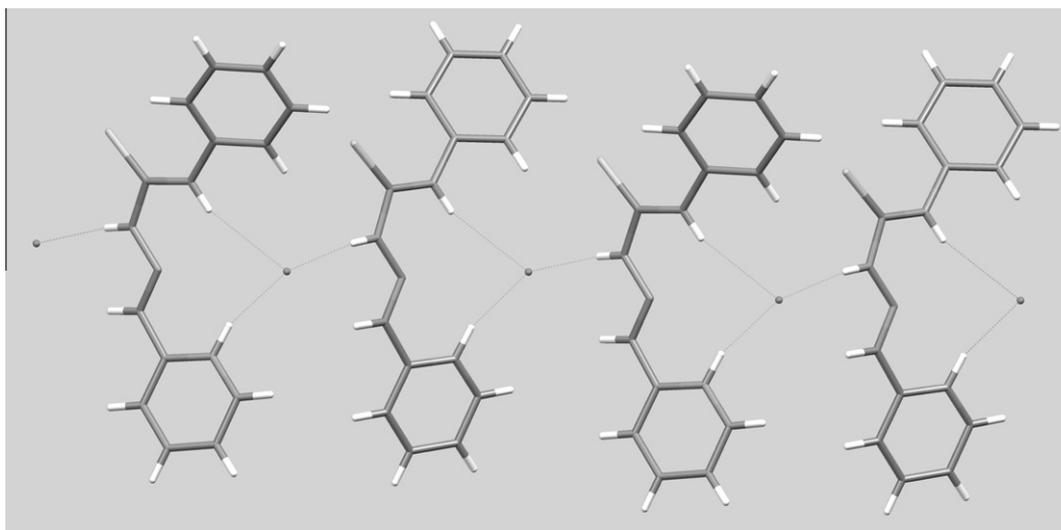
The molecular packing of [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) (see Fig. 7) reveals that an inter-molecular short-contact occurs between Sb(III) and Cl(2) (sum of van der Waals radii less 0.3 Å) which gives rise to a

pseudo-octahedral environment. In this case the short-contact between Sb(III) and Cl(2) together with the N(4)–H hydrogen bond give rise to a tri-dimensional network (see Table 4).

In the complexes the expected lengthening of the C(8)–S(1) bonds from 1.665(2) Å in H2Fo4Ph-HCl to 1.741(2) Å in **1a** and from 1.677(2) Å in H2Ac4Ph [25] to 1.749(3) Å in **2**, together with

Table 3Selected bond angles for H₂Fo4Ph·HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]-2DMSO (**1a**), H₂Ac4Ph, [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**) and [Sb(2Bz4Ph)Cl₂] (**3**).

Atoms	Angle (°)				
	H ₂ Fo4Ph·HCl	[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂]-2DMSO (1a)	H ₂ Ac4Ph[25]	[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂][13] (3)
N(2)–Sb(1)–N(1)		68.80(6)		69.40(9)	70.31(12)
N(1)–Sb(1)–Cl(2)		83.97(5)		83.45(7)	
N(1)–Sb(1)–S(1)		145.08(5)		145.73(6)	144.82(10)
N(2)–Sb(1)–Cl(1)		79.92(5)		84.43(7)	
Cl(2)–Sb(1)–Cl(1)		162.82(3)		162.78(3)	158.55(4)
N(2)–Sb(1)–Cl(2)		83.84(5)		81.40(7)	83.26(9)
N(2)–Sb(1)–S(1)		76.40(5)		76.47(6)	74.51(8)
Cl(2)–Sb(1)–S(1)		89.69(2)		91.36(3)	
N(1)–Sb(1)–Cl(1)		84.96(5)		82.44(7)	
S(1)–Sb(1)–Cl(1)		91.90(2)		94.77(3)	
N(1)–C(2)–C(7)	118.55(16)	115.9(2)	116.21(3)	114.6(3)	115.3(3)
C(2)–C(7)–N(2)	118.68(16)	120.7(2)	114.93(2)	116.8(3)	117.4(4)
C(7)–N(2)–N(3)	116.98(15)	115.3(2)	118.8(2)	115.9(2)	115.4(3)
C(8)–N(3)–N(2)	121.31(16)	115.7(2)	118.9(2)	116.7(2)	116.0(3)
N(3)–C(8)–S(1)	116.59(14)	126.2(2)	119.7(1)	126.1(2)	126.1(3)
S(1)–C(8)–N(4)	127.86(13)	115.1(2)	125.5(2)	115.1(2)	115.6(3)
N(3)–C(8)–N(4)	115.69(14)	118.8(2)	114.8(2)	118.8(3)	118.2(3)
C(8)–N(4)–C(9)	128.77(15)	130.2(2)	127.6(2)	129.9(3)	130.2(4)

**Fig. 5.** Molecular packing of H₂Fo4Ph·HCl.

the shortening of the N(3)–C(8) bonds from 1.368(2) Å in H₂Fo4Ph·HCl to 1.318(3) Å in **1a** and 1.358(3) Å in H₂Ac4Ph to 1.308(4) Å in **2**, were observed. Therefore, the C(8)–S(1) bond changes from a double to a predominantly single bond whereas N(3)–C(8) acquires some double bond character.

The bond distances between antimony and the imine nitrogen, 2.247(2) Å in **1a** and 2.234(2) Å in **2**, are shorter than the distance between antimony and the pyridine nitrogen, 2.502(2) Å in **1a** and 2.356(3) Å in **2**. In **2** the Sb(1)–Cl(1) bond is shorter than the Sb(1)–Cl(2) bond probably due to the presence of a short-contact interaction between Cl(2) from one molecule and the antimony of a neighbor molecule (see Table 2 and Fig. 7).

A twisting of approximately 180° in the N(3)–C(8) bond of the thiosemicarbazones to match the steric requirements of tridentate coordination was evidenced. Hence, some angles undergo significant changes on complexation. The C(8)–N(3)–N(2) angle goes from 121.31(16)° in H₂Fo4Ph·HCl to 115.7(2)° in **1a** and from 118.9(2)° in H₂Ac4Ph [25] to 116.7(2)° in **2**; N(3)–C(8)–S(1) goes from 116.59(14)° in H₂Fo4Ph·HCl to 126.2(2)° in **1a** and 119.7(1)° in H₂Ac4Ph [25] to 126.1(2)° in **2**; N(4)–C(8)–S(1) varies

from 127.86(13)° in the free base to 115.1(2)° in **1a** and 125.5(2)° in H₂Ac4Ph [25] to 115.1(2)° in **2**.

3.4. Antitrypanosomal activity

Table 5 reports the cytotoxicities and the IC₅₀ values for growth inhibition induced by the studied compounds, on trypomastigote and epimastigote forms of *T. cruzi*. Dose–response curves were obtained in all cases but in some cases we were unable to determine the IC₅₀ values.

H₂Fo4Ph proved to be highly cytotoxic. We could not determine its IC₅₀ value against both forms of the parasitic cycle. Its antimony(III) complex (**1**) exhibited growth inhibition activity against both trypomastigote and epimastigote forms of *T. cruzi* with similar values of IC₅₀ (1.2 μM), which were lower than the IC₅₀ determined for benzimidazole and nifurtimox against both forms. However it revealed to be cytotoxic at approximately the same dose (~1 μM).

H₂Ac4Ph was active against the epimastigote form at high doses (IC₅₀ = 52.8 μM), being cytotoxic at concentrations lower than 1 μM. Complex (**2**) was active at low doses (IC₅₀ = 1.23 μM)

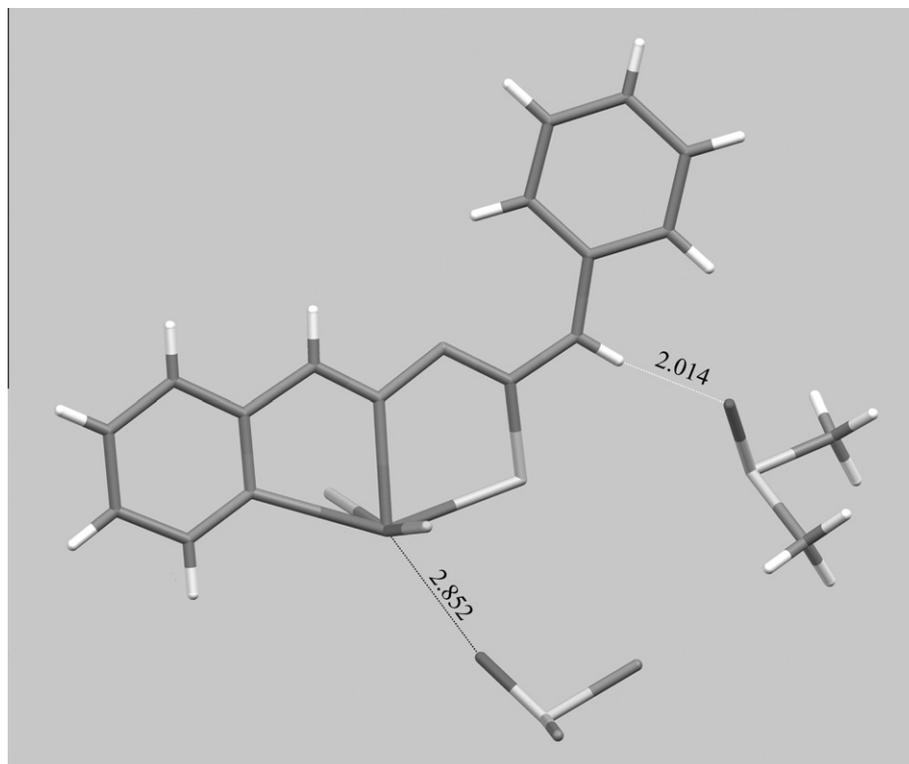


Fig. 6. Short-contacts of [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]·2DMSO (**1a**).

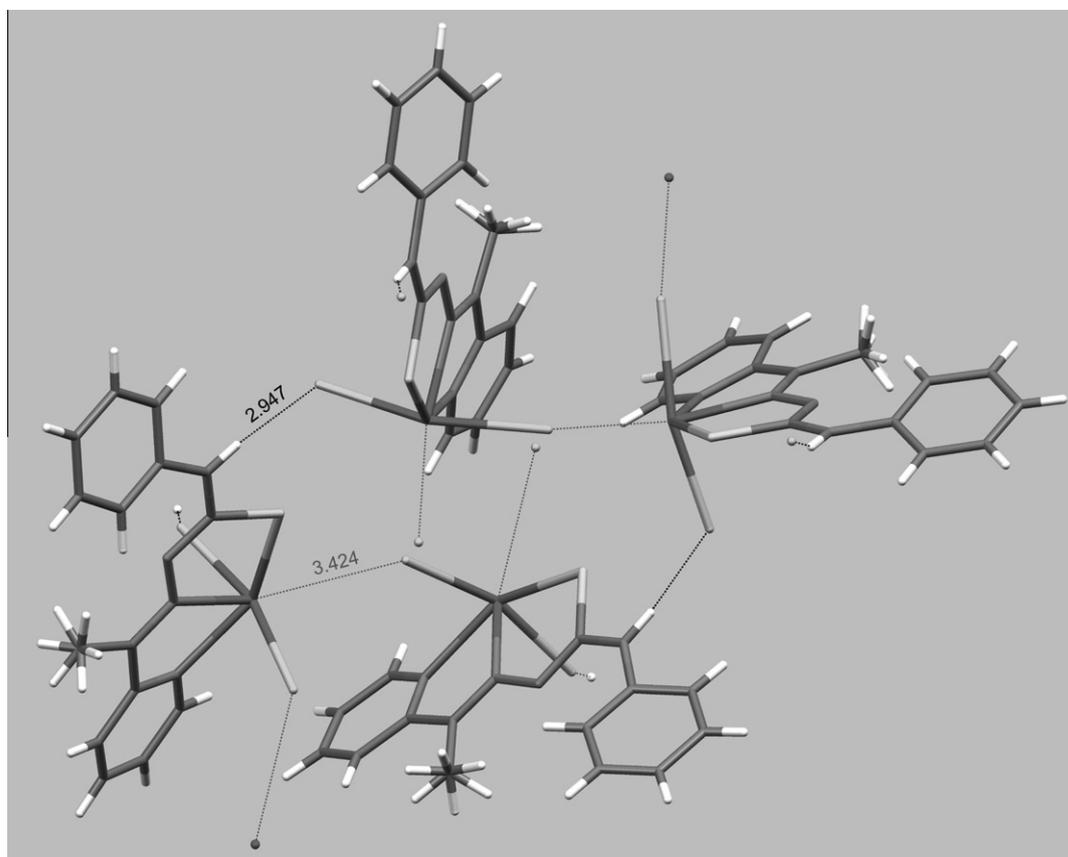


Fig. 7. Molecular packing of [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**).

Table 4Hydrogen bonds distances (Å) and angles (°) for H₂Fo4Ph-HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]₂DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**).

	D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	(D–H...A)	Symmetry operation ^a
H ₂ Fo4Ph-HCl	N(3)–H(3A)...Cl(1)	0.81(2)	2.45(2)	3.2572(18)	171.6(17)	[–x + 3/2, y, z – 1/2]
	N(4)–H(4A)...Cl(1)	0.884(18)	2.641(19)	3.4904(16)	161.4(15)	intra-molecular
	N(1)–H(1A)...Cl(1)	0.92(2)	2.13	3.0125(16)	161.1(18)	intra-molecular
[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] ₂ DMSO (1a)	N(4)–H(4A)...O(3A)	0.86	2.014	2.850(3)	163.8	[x, y, z + 1]
[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	N(4)–H(4A)...Cl(1)	0.86	2.54	3.314(3)	150.5	[–x + 1/2, y – 1, z]

^a The symmetry transformations used to generate equivalent atoms are bracketed.**Table 5**Antitrypanosomal activity of H₂Fo4Ph, H₂Ac4Ph and H₂Bz4Ph, their Sb(III) complexes, antimony chloride and the reference compounds benznidazole (bnz) and nifurtimox (nfx).

Compound	Cytotoxicity ^b (μmol L ⁻¹)	IC ₅₀ trypano ^a (μmol L ⁻¹)	IC ₅₀ epi ^a (μmol L ⁻¹)
H ₂ Fo4Ph	<1	ND	ND
[Sb(2Fo4Ph)Cl ₂] (1)	<1	1.27	1.23
H ₂ Ac4Ph	<1	ND	52.78
[Sb(2Ac4Ph)Cl ₂] (2)	<1	1.23	ND
H ₂ Bz4Ph	<3.00	14.41	ND
[Sb(2Bz4Ph)Cl ₂] (3)	<1.91	8.39	2.10
SbCl ₃	<4.38	65.75	6.79
bnz	96.06	6.26	6.65
nfx	3.48	2.75	1.88

bnz = benznidazole; nfx = nifurtimox; ND = not determined; ND (“Not Determined”): data of activity were acquired in a dose–response curve but no linear regression was obtained from the curves.

^a Calculated at seven concentrations using data obtained from at least three independent experiments, with a SD less than 10% in all cases.^b Expressed as the highest concentration tested that was not cytotoxic for the BALB/c mice splenocytes. Calculated at six concentrations using data obtained from at least three independent experiments, with a SD less than 10% in all cases. Values in M are showed in parentheses.

against the bloodstream trypomastigote form, being more active than both nifurtimox and benznidazole. Nevertheless it proved to be cytotoxic at doses lower than 1 μM.

H₂Bz4Ph was moderately active against the infecting trypomastigote form (IC₅₀ = 14.41 μM) while its cytotoxicity was lower than those of all other thiosemicarbazones. Complex (**3**) proved to be more active against the epimastigote (IC₅₀ = 2.10 μM) than against the trypomastigote form (IC₅₀ = 8.39 μM); its cytotoxicity was the lowest among all ligands and complexes.

The antimony salt SbCl₃ was more active against the proliferative epimastigote form than against the trypomastigote form, but high doses were required for the inhibition of trypomastigotes' growth. As a consequence, its cytotoxicity was the lowest among all studied compounds.

The antimony complexes proved to have antitrypanosomal activity. In all cases activity is higher than that of the starting salt. Complexes (**1**) and (**2**) were more active than the reference drugs nifurtimox and benznidazole. However the studied compounds did not reveal to be good as antitrypanosomal drug candidates mainly due to their cytotoxicities. It is worth mentioning that the determined values of IC₅₀ for nifurtimox demonstrated that it was more active against the more susceptible epimastigote form and that its cytotoxic effects occur at doses slightly higher to those effective in the inhibition of the parasite growth.

4. Conclusions

The antimony(III) complexes presented antitrypanosomal activity against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*. Some of the compounds exhibited higher activity than the reference drugs nifurtimox and benznidazole. However the studied

compounds presented cytotoxicity at doses lower than their IC₅₀ values, suggesting that they are not good as new antitrypanosomal drug candidates.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and INCT-INOFAR, Proc. CNPq 573.364/2008–6).

Appendix A. Supplementary data

CCDC 791172, 791170 and 791171 contain the supplementary crystallographic data for H₂Fo4Ph-HCl, [Sb(2Fo4Ph)Cl₂]₂DMSO (**1a**) and [Sb(2Ac4Ph)Cl₂] (**2**). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/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

- M. Boiani, L. Boiani, A. Merlino, P. Hernández, A. Chidichimo, J.J. Cazzulo, H. Cerecetto, M. González, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 4426.
- A. Gerpe, G. Álvarez, D. Benítez, L. Boiani, M. Quiroga, P. Hernández, M. Sortino, S. Zucchini, M. González, H. Cerecetto, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7500.
- M. Cabrera, M.L. Lavaggi, P. Hernández, A. Merlino, A. Gerpe, W. Porcal, M. Boiani, A. Ferreira, A. Monge, A.L. Cerain, M. González, H. Cerecetto, Toxicol. Lett. 190 (2009) 140.
- S.A. Dzamitika, C.A.B. Falcão, F.B. Oliveira, C. Marbeuf, A. Garnier-Suillerot, C. Demicheli, B. Rossi-Bergmann, F. Frézard, Chem. Biol. Interact. 160 (2006) 217.
- H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem. 4 (2004) 31.
- D.C. Greenbaum, Z. Mackey, E. Hansell, P. Doyle, J. Gut, C.R. Caffrey, J. Lehrman, P.J. Rosenthal, J.H. McKerrow, K. Chibale, J. Med. Chem. 47 (2004) 3212.
- S.P. Fricker, R.M. Mosi, B.R. Cameron, I. Baird, Y. Zhu, V. Anastassov, J. Cox, P.S. Doyle, E. Hansell, G. Lau, J. Langille, M. Olsen, L. Qin, R. Skerlj, R.S.Y. Wong, Z. Santucci, J.H. McKerrow, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 1839.
- I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron 26 (2007) 3263.
- I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571.
- J.G. Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301.
- A.P. Rebollo, L.R. Teixeira, A.A. Batista, A.S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, P. Hernández, A.M. Ferreira, N.L. Speziali, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 939.
- C. Rodrigues, A.A. Batista, J. Ellena, E.E. Castellano, D. Benítez, H. Cerecetto, M. González, L.R. Teixeira, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2847.
- D.C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M.S. Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 3904.
- G.M. Sheldrick, SHELXS-97: Program for Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- G.M. Sheldrick, SHELXL-97: Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- L.J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 837.
- L.J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 30 (1997) 565.
- I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M.K. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, Acta Crystallogr. B58 (2002) 389.
- V.R.A. Pereira, V.M.B. Lorena, A.P.G. Silva, E.M. Coutinho, E.D. Silva, A.G.P. Ferreira, P. Miranda, M.A. Krieger, S. Goldenberg, M.B.P. Soares, R. Correa-Oliveira, Y.M. Gomes, Parasitology 129 (2004) 563.
- A.P. Rebollo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M.S. Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698.
- A.E. Graminha, C. Rodrigues, A.A. Batista, L.R. Teixeira, E.S. Fagundes, H. Beraldo, Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 69 (2008) 1073.

- [22] A.P. Rebolledo, G.M. Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 945.
- [23] 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.
- [24] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, second ed., Wiley-Interscience, New York, 1970.
- [25] E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D.X. West, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 625 (1999) 961.



Lucas Ferreira da Rocha is a technician and works at the Immunogenetics Laboratory, Immunology Department of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, Brazil. He carries on immunomodulation assays and evaluation of anti-parasitic activities of natural and synthetic compounds.



Josane A. Lessa received her BSc degree in Chemistry from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro (2006). She earned her Master's Degree in Natural Sciences from the same institution (2008). Currently, she is a PhD student in Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Her scientific interests involve Medicinal Inorganic Chemistry and Coordination Chemistry. Her experiences are based on design and syntheses of bioactive organic molecules and their metal complexes, and evaluation of antimicrobial activities.



Valeria R.A. Pereira received her PhD (2003) in Cellular and Molecular Biology from Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Brazil. She is currently a researcher at the Department of Immunology in Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ)-Recife, Brazil, and develops researches that include: *in vitro* studies of immunomodulatory and anti-parasitic activities of synthetic chemicals and natural products against *T. cruzi* and *Leishmania spp.*; and studies in experimental and human immunoparasitology of Chagas disease and Leishmaniasis (L), to determine the cellular immune response profile in parasite-specific peripheral blood from patients with active L and after clinical cure.



Débora Costa Reis earned her BSc degree in Chemistry from Universidade Federal de Uberlândia, Brazil (2004). She earned a Master's Degree in Chemistry from Universidade Federal de Minas Gerais (2006) with emphasis in Natural Products Chemistry. She is currently a PhD student at Universidade Federal de Minas Gerais with emphasis in Medicinal Inorganic Chemistry. Her experience involves the syntheses and investigation of the pharmacological profile of bioactive molecules and their metal complexes.



Cristiane M.L. Melo earned her BSc. degree in Biological Sciences (2004) from Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. She received her Master's Degree (2007) in Biological Sciences with emphasis on Biotechnology and a PhD degree (2009) in Biological Science with emphasis in Immunology both from Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. She is presently a visiting researcher at Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ), Recife, Brazil. She has experience in Cellular Biology and her studies involve immunology, parasitology, histology and pathology.



Isolda C. Mendes received her B.Sc. (1998) and Ph.D. (2007) in Chemistry from Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. She has experience in Inorganic Chemistry, Bio-Inorganic Chemistry and Scientific Conservation of Art Objects, Archaeological Sites, and Monuments. She carries on research in X-rays diffraction and fluorescence, crystal structure determination, coordination chemistry, and deterioration mechanisms of art objects. Member of the Brazilian Chemical Society, the Brazilian Association of Crystallography and the International Council of Museums - ICOM. Now working at the School of Fine Arts of Universidade Federal de

Minas Gerais, Brazil, as conservation scientist.



Heloisa Beraldo received her PhD degree (Docteur d'État ès Sciences Physiques) from Université Paris VI (1984). She is presently Professor of Chemistry at Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Her research interests are centered on Inorganic Medicinal Chemistry, with emphasis on metal-based drugs design, and the effects of metal coordination on the pharmacological profile of organic compounds, antimicrobials, cytotoxic/antitumoral agents and anti-inflammatory agents.



Nivaldo Speziali received his PhD degree (Docteur ès Sciences) from Université de Lausanne, Switzerland (1989). He is presently Associate Professor of Physics at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil; Head of the Laboratory of Crystallography - UFMG; President of the Brazilian Crystallographic Association. Scientific interests in X-ray diffraction (single and polycrystals); structural of solids, thermotropic phase transitions, aperiodic systems, modulated phases, magnetic materials, coordination compounds.



Original article

2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas

Josane A. Lessa^a, Isolda C. Mendes^a, Paulo R.O. da Silva^b, Marcella A. Soares^b, Raquel G. dos Santos^b, Nivaldo L. Speziali^c, Nelilma C. Romeiro^{d,e}, Eliezer J. Barreiro^d, Heloisa Beraldo^{a,*}

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

^b Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d LASSBio—Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68023, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e LICC-NUPEM-UFRJ—Laboratório Integrado de Computação Científica, Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-ambiental de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 27901-000 Macaé, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2010

Received in revised form

31 August 2010

Accepted 8 September 2010

Available online 17 September 2010

Keywords:

2-Acetylpyridine thiosemicarbazones

Glioma

Cytotoxicity

ABSTRACT

2-Acetylpyridine *N*(4)-phenyl thiosemicarbazone (H2Ac4Ph), and its *N*(4)-*ortho*-tolyl (H2Ac4oT), *N*(4)-*meta*-tolyl (H2Ac4mT), *N*(4)-*para*-tolyl (H2Ac4pT), *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl (H2Ac4oClPh), *N*(4)-*meta*-chlorophenyl (H2Ac4mClPh) and *N*(4)-*para*-chlorophenyl (H2Ac4pClPh) derivatives were assayed for their cytotoxicity against RT2 (expressing p53 protein) and against T98 (expressing mutant p53 protein) glioma cells. The compounds were highly cytotoxic against RT2 (IC₅₀ = 24–1.4 nM) and T98 cells (IC₅₀ = 50–1.0 nM). IC₅₀ for cisplatin = 5 (RT2) and 17 μM (T98). The thiosemicarbazones presented haemolytic activity with IC₅₀ > 10⁻³M, indicating a very good therapeutic index. SAR studies suggested that stereo properties are critical to define the potential activity of the studied compounds against the RT2 cell line, while electronic properties seem to be important for interaction with the biological target in T98 cells.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Thiosemicarbazones constitute an interesting class of compounds with wide pharmacological versatility [1]. α (N)-heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes have been extensively investigated as potential anticancer agents [2]. This search for an effective anticancer agent led to the onset of clinical studies of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP; Triapine[®], Vion Pharmaceuticals Inc, New Haven, CT) [3,4].

It has been demonstrated that the mechanism of action of α (N)-heterocyclic thiosemicarbazones involves inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), a rate-limiting enzyme in DNA syntheses, which catalyzes the conversion of ribonucleotides into desoxiribonucleotides [2–5]. It has been suggested that thiosemicarbazones may act by various mechanisms to inhibit RDR activity [6].

The cytotoxic activity of thiosemicarbazones and their metal complexes against a variety of human solid tumor cell lines as well as

against leukemia has been demonstrated by other authors [7–11] and by our group [12–16]. We recently demonstrated that 2-pyridineformamide thiosemicarbazones and their gallium(III) and tin (IV) complexes present cytotoxicity against malignant glioma [17,18].

In the present work 2-acetylpyridine *N*(4)-phenyl thiosemicarbazone (H2Ac4Ph) and its *N*(4)-*ortho*-tolyl (H2Ac4oT), *N*(4)-*meta*-tolyl (H2Ac4mT), *N*(4)-*para*-tolyl (H2Ac4pT), *N*(4)-*ortho*-chlorophenyl (H2Ac4oClPh), *N*(4)-*meta*-chlorophenyl (H2Ac4mClPh) and *N*(4)-*para*-chlorophenyl (H2Ac4pClPh) derivatives (Fig. 1) were assayed for their cytotoxic activity against malignant glioma cells.

Malignant gliomas frequently have abnormalities in p53 protein expression or function. We used two glioma cell lines exhibiting different p53 status: the rat glioma RT2 cells, which express wild-type p53 and human glioma T98 cells, expressing mutant p53. Structure–activity relationships (SAR) were investigated.

2. Results and discussion

2.1. Characterization of the thiosemicarbazones

The thiosemicarbazones were prepared as described in the literature [19]. Microanalyses and NMR data are compatible with the

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3499 5740; fax: +55 31 3499 5700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

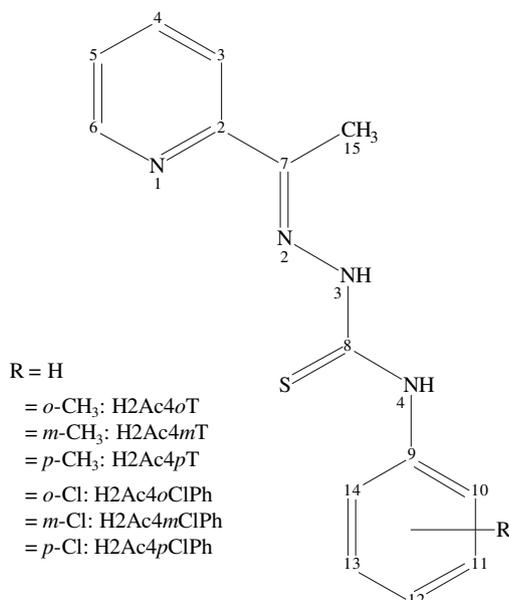


Fig. 1. Generic structure of *N*(4)-phenyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazone derivatives.

formation of H2Ac4Ph, H2Ac4*o*T, H2Ac4*m*T, H2Ac4*p*T, H2Ac4*o*ClPh, H2Ac4*m*ClPh and H2Ac4*p*ClPh.

Duplicated signals were observed in the ¹H NMR spectra of all thiosemicarbazones (DMSO-*d*₆) suggesting a mixture of the *E* (95%) and *Z* (5%) configurational isomers. The N3–H chemical shifts at δ 10.94–10.61 ppm, indicate *E* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the solvent [12–14], and the chemical shifts at δ 14.79–14.16 ppm, indicate *Z* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the pyridine nitrogen [12–14].

Upon slow evaporation of the ethanol solutions of the thiosemicarbazones, crystals of H2Ac4*o*T, H2Ac4*o*ClPh, H2Ac4*m*ClPh and H2Ac4*p*ClPh were formed and the molecular structures were determined by X-ray diffraction.

2.2. X-ray diffraction analysis

Fig. 2 shows perspective views of H2Ac4*o*T, H2Ac4*o*ClPh, H2Ac4*m*ClPh and H2Ac4*p*ClPh. Table 1 reports the crystal data and refinement results for the determined structures. The crystal structures of H2Ac4Ph [20] and H2Ac4*m*T [21] have been previously determined. Selected intra-molecular bond distances and angles for H2Ac4Ph [20], H2Ac4*o*T, H2Ac4*m*T [21], H2Ac4*o*ClPh, H2Ac4*m*ClPh and H2Ac4*p*ClPh are given in Tables 2 and 3. As expected the distances and angles observed for the six thiosemicarbazones are comparable.

In five of the six structures the bond distances are very similar. The S1–C8 bond varies from 1.669 to 1.674 Å and the C2–C7 bond varies from 1.484 to 1.493 Å. The N2–N3, N4–C8 and N4–C9 bonds are observed in the 1.374–1.381 Å, 1.339–1.349 Å and 1.421–1.433 Å, ranges, respectively. In H2Ac4*o*ClPh all these distances are shorter (see Table 2).

In all thiosemicarbazones the bond angles are also similar, but some differences were observed for the N3–C8–S1, N4–C8–S1 and C8–N4–C9 bond angles. As expected, these angles are closer in the case of H2Ac4Ph and H2Ac4*p*ClPh than for the other members of the family, which present the tolyl methyl group in *ortho* or in *meta* position.

All thiosemicarbazones adopt the *EE* conformation in the solid. Weak intra-molecular N4–H···N2 hydrogen bonds (see Table 4) are present in the structures of H2Ac4*o*T and H2Ac4*o*ClPh, which

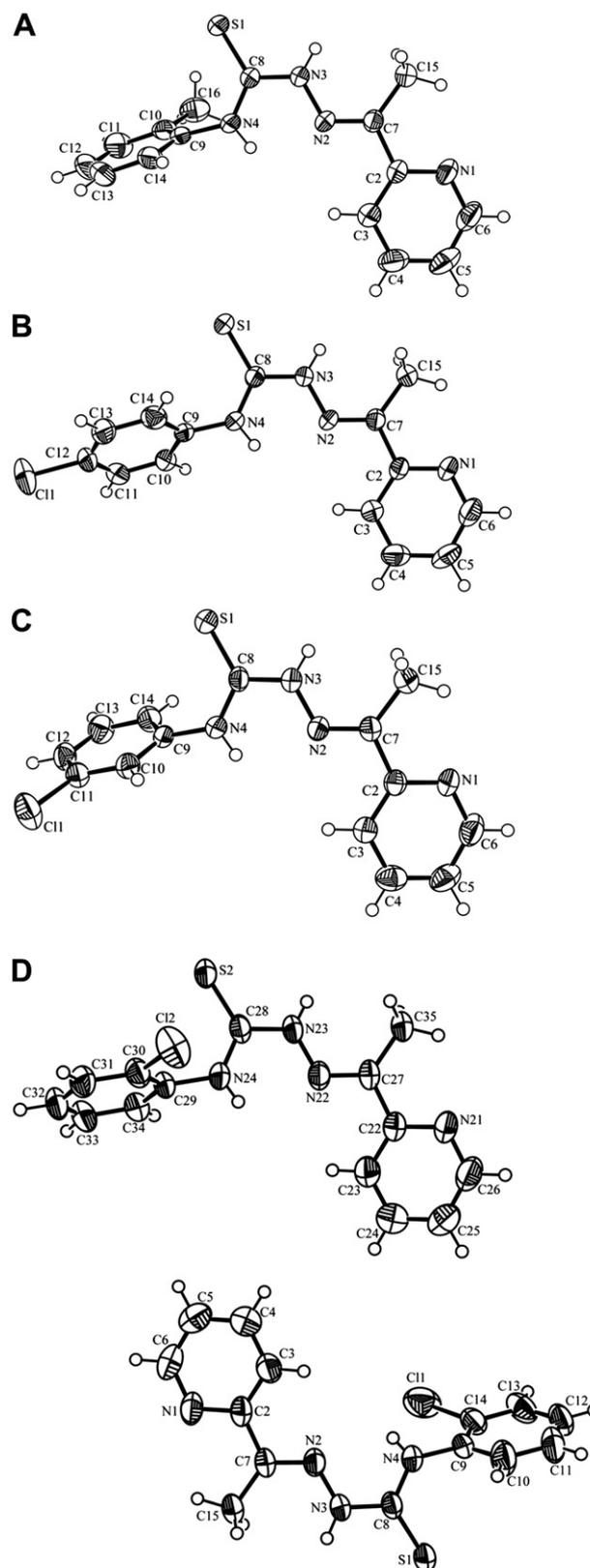


Fig. 2. Molecular plot of H2Ac4*o*T (A), H2Ac4*p*ClPh (B), H2Ac4*m*ClPh (C) and H2Ac4*o*ClPh (D) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 1
Crystal data and refinement results for H2Ac4oT, H2Ac4oCIPh, H2Ac4mCIPh and H2Ac4pCIPh.

Compound	H2Ac4oT	H2Ac4oCIPh	H2Ac4mCIPh	H2Ac4pCIPh
Empirical formula	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S
Formula weight	284.38	304.79	304.79	304.79
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P</i> 2(1)/ <i>c</i>	<i>P</i> –1	<i>P</i> 2(1)/ <i>c</i>	<i>P</i> 2(1)/ <i>n</i>
Diffractometer	Oxford	Siemens	Oxford	Oxford
Wavelength, Å	0.71073	0.71073	1.54184	0.71073
Unit cell dimensions				
<i>a</i> , Å	5.7088(11)	10.358(3)	10.4677(10)	10.3223(5)
<i>b</i> , Å	10.488(2)	11.913(3)	5.6407(6)	5.7130(3)
<i>c</i> , Å	24.589(5)	12.912(3)	24.518(3)	25.5526(13)
α , °	90	68.830(10)	90	90
β , °	92.23(3)	73.770(10)	100.183(11)	93.684(5)
γ , °	90	83.910(10)	90	90
Volume, Å ³	1471.1(5)	1426.5(6)	1424.9(3)	1503.76(13)
Z, Density calc., Mg/m ³	4, 1.284	4, 1.419	4, 1.421	4, 1.346
Absorption coefficient, mm ⁻¹	0.216	0.409	3.697	0.388
F(000)	600	632	632	632
Crystal size, mm	0.46 × 0.36 × 0.13	0.36 × 0.20 × 0.10	0.30 × 0.16 × 0.08	0.20 × 0.10 × 0.05
θ range for data coll., °	5.11–26.35	1.75–25.00	3.66–62.51	3.01 to 26.37
Index range, θ	–7 ≤ <i>h</i> ≤ 4 –13 ≤ <i>k</i> ≤ 12 –22 ≤ <i>l</i> ≤ 30	0 ≤ <i>h</i> ≤ 12 –13 ≤ <i>k</i> ≤ 13 –14 ≤ <i>l</i> ≤ 15	–12 ≤ <i>h</i> ≤ 12 –5 ≤ <i>k</i> ≤ 6 –27 ≤ <i>l</i> ≤ 28	–10 ≤ <i>h</i> ≤ 12 –7 ≤ <i>k</i> ≤ 7 –31 ≤ <i>l</i> ≤ 31
Completeness	$\theta = 26.35^\circ$ 97.1%	$\theta = 25.00^\circ$ 97.3%	$\theta = 62.51^\circ$ 98.9%	$\theta = 26.35^\circ$ 99.9%
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.025	1.030	0.983	0.781
Reflec. collect./unique (<i>R</i> _{int})	13209/2904 (0.0363)	5257/4888 (0.0201)	7467/2251 (0.0500)	6975/3055 (0.0405)
Data/restraints/parameters	2904/0/185	4888/0/389	2251/0/181	3055/0/182
Observed reflections, <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	1968	2430	1464	1512
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0440, <i>wR</i> ₂ = 0.046	<i>R</i> ₁ = 0.0465, <i>wR</i> ₂ = 0.1076	<i>R</i> ₁ = 0.0398, <i>wR</i> ₂ = 0.0854	<i>R</i> ₁ = 0.0371, <i>wR</i> ₂ = 0.0625
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0866, <i>wR</i> ₂ = 0.0987	<i>R</i> ₁ = 0.0760, <i>wR</i> ₂ = 0.1229	<i>R</i> ₁ = 0.0734, <i>wR</i> ₂ = 0.0960	<i>R</i> ₁ = 0.1001, <i>wR</i> ₂ = 0.0707
Large peak & hole, e Å ⁻³	0.217/–0.210	0.187/–0.309	0.173/–0.244	0.168/–0.183

probably do not facilitate rotation around the N3–C8 bond. In the packing of all thiosemicarbazones an inter-molecular N–H...S hydrogen bond occurs (see Fig. 3 and Table 4).

2.3. Cytotoxic activity against malignant RT2 and T98 glioma cells

2.3.1. Thiosemicarbazones induce membrane changes characteristics of apoptosis

A wide range of phenotypic modifications occurred in glioma cells after exposure to the thiosemicarbazones. Fig. 4 shows, as examples, control glioma cells and cells treated with H2Ac4oCIPh. After treatment with all thiosemicarbazones, retraction of the cytoplasmic expansions, leading to round shaped cells, cell shrinkage and blebs formation were noticed. Reduction of the number of cells after treatment was also observed. These morphological changes are associated with apoptosis.

2.3.2. Thiosemicarbazones induce nuclear changes characteristics of apoptosis

Triggering of programmed cell death (apoptosis) induces DNA fragmentation through the activation of specific DNA endonucleases

[22]. Activation of nucleases can be evidenced through the use of DNA staining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), which detects fragmented and condensed DNA. No DNA fragmentation was observed in the untreated cells, but following exposure to the thiosemicarbazones, cells exhibited extensive DNA fragmentation as seen in Fig. 5 for H2Ac4oCIPh.

2.3.3. Cytotoxic activity

The concentrations of the studied compounds which kill 50% of RT2 and T98 glioma cells (IC₅₀) are listed in Table 5. All thiosemicarbazones were highly active against malignant glioma with IC₅₀ values in the 24–1.4 nM range against RT2 cells and in the 50–1.0 nM range against malignant T98 glioma cells. The determined IC₅₀ values for cisplatin were found to be 5 μ M and 17 μ M against RT2 and T98 cells, respectively. All thiosemicarbazones were able to induce cell death by apoptosis. Interestingly the thiosemicarbazones presented haemolytic activity with much higher IC₅₀ values (>10⁻³ M), indicating a very good therapeutic index.

The unsubstituted H2Ac4Ph as well as the *ortho*-, *meta* and *para*-chlorophenyl derivatives were more active than the *N*(4)-tolyl derivatives against both cell lineages.

Table 2
Selected bond distances (Å) for 2-acetylpyridine *N*(4)-phenyl thiosemicarbazone and its derivatives.

Atoms	H2Ac4Ph [20]	H2Ac4oCIPh ^a	H2Ac4mCIPh	H2Ac4pCIPh	H2Ac4oT	H2Ac4mT [21]
S1–C8	1.677(2)	1.654(3)	1.654(3)	1.669(3)	1.671(2)	1.671(3)
C2–C7	1.486(2)	1.474(4)	1.472(4)	1.487(4)	1.484(2)	1.488(4)
N2–C7	1.284(3)	1.281(3)	1.278(3)	1.290(3)	1.283(2)	1.289(3)
N2–N3	1.376(2)	1.362(3)	1.361(3)	1.378(3)	1.374(2)	1.381(3)
N3–C8	1.358(3)	1.359(3)	1.351(3)	1.354(3)	1.352(2)	1.359(3)
N4–C8	1.346(3)	1.328(4)	1.336(3)	1.349(3)	1.341(2)	1.339(3)
N4–C9	1.421(3)	1.413(3)	1.421(3)	1.430(3)	1.423(2)	1.429(3)
C–Cl1	–	1.679(11)	1.724(3)	1.741(3)	1.7411(19)	–
		1.800(14)				

^a There are two molecules in the asymmetric unit.

Table 3
Selected bond angles for 2-acetylpyridine *N*(4)-phenyl thiosemicarbazone and its derivatives.

Atoms	H2Ac4Ph	H2Ac4oClPh	H2Ac4mClPh	H2Ac4pClPh	H2Ac4oT	H2Ac4mT
N2N3C8	118.9(2)	118.2(2)	118.9(2)	119.0(2)	118.66(15)	118.25(16)
N3C8S1	119.7(1)	121.0(2)	121.5(2)	121.2(2)	119.99(15)	120.83(14)
N4C8N3	114.8(2)	114.7(2)	114.4(2)	114.4(2)	114.71(17)	114.46(17)
N4C8S1	125.5(2)	124.3(2)	124.1(2)	124.3(2)	125.26(14)	124.71(15)
C7N2N3	118.8(2)	119.1(2)	118.7(2)	118.7(2)	118.86(15)	118.99(16)
C8N4C9	127.6(2)	125.1(3)	123.5(2)	125.4(2)	126.87(17)	127.09(17)

Table 4
Hydrogen bond distances [Å] and angles [°] for H2Ac4oT, H2Ac4oClPh, H2Ac4mClPh and H2Ac4pClPh with $d(\text{H}\cdots\text{A}) < r(\text{A}) + 2.00 \text{ \AA}$ and $\langle \text{D}-\text{H}\cdots\text{A} \rangle > 110^\circ$.

	D–H⋯A	d(D–H)	d(H⋯A)	d(D⋯A)	(D–H⋯A)	Symmetry operation
H2Ac4oT	N3–H3A⋯S1	0.86	2.77	3.628(2)	174.3	[–x + 1, –y, –z + 1]
	N4–H4A⋯N2	0.86	2.14	2.571(2)	110.5	Intra-molecular
H2Ac4oClPh	N3–H3A⋯S1	0.86	2.67	3.533(3)	176.3	[x – 1, y, z – 1]
	N23–H23A⋯S21	0.86	2.76	3.569(3)	176.3	[x + 1, y, z + 1]
	N4–H4A⋯N2	0.86	2.146	2.560(2)	116.21	Intra-molecular
H2Ac4mClPh	N3–H3A⋯S1	0.86	2.77	3.631(2)	174.2	[–x + 1, –y + 1, –z]
H2Ac4pClPh	N3–H3A⋯S1	0.86	2.80	3.655(2)	173.6	[–x, –y – 2, –z – 1]

2.4. SAR studies

Theoretical calculations were performed in order to investigate stereo-electronic properties of the studied thiosemicarbazones. Since the number of molecules was not enough for a QSAR investigation, SAR studies were carried out, to identify physico-chemical properties that may be involved in the mechanism of action of these compounds.

Properties of interest in this study were highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies, dipole moment, polar superficial area (PSA), molecular area and molecular volume, which were correlated to pIC_{50} ($-\log \text{IC}_{50}$). Geometric properties, such as molecular area and volume may offer information over stereo features for drug-receptor interactions. PSA indicates the potential hydrogen bonding of the molecules. Additionally, 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 susceptibility to electrophilic attack while LUMO energy is closely related to susceptibility to nucleophilic attack.

The cytotoxicity against glioma cells and stereo electronic parameters for the *E* and *Z* isomers of the thiosemicarbazones are displayed in Table 6. In general there were no significant differences between the properties of the *E* and *Z* isomers.

The *N*(4)-tolyl thiosemicarbazones (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) were the less active compounds against both cell lines. *N*(4)-chlorophenyl thiosemicarbazones (H2Ac4oClPh, H2Ac4mClPh and H2Ac4pClPh) were the most active against T98 cells and H2Ac4Ph and H2Ac4oClPh were the most active against RT2 cells. According to Table 6 *N*(4)-tolyl thiosemicarbazones have the largest volumes among the studied compounds and showed the highest values of LUMO energy. In general PSA and HOMO energies of all compounds were very close. However, the most active compounds against T98 cells (H2Ac4oClPh, H2Ac4mClPh and H2Ac4pClPh) presented the lowest values of HOMO energy.

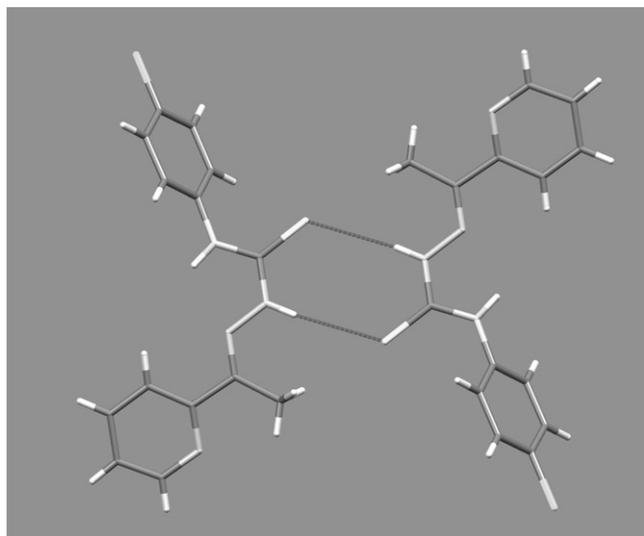


Fig. 3. Molecular packing of H2Ac4pClPh (B) showing the scheme of hydrogen bonding between N⋯H and S atoms.

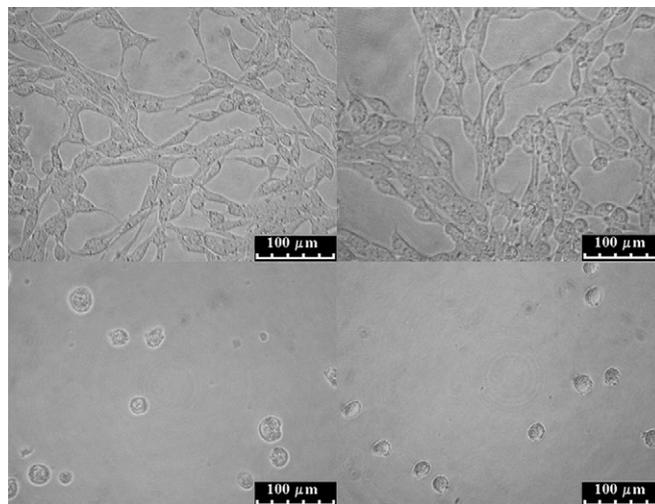


Fig. 4. Cells treated with thiosemicarbazones exhibit membrane changes characteristic of apoptosis. RT2 (left) and T98 (right) cells were treated with H2Ac4oClPh ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, bottom) or dilute (top) in culture dishes. After 48 h treatment the dishes were observed under phase contrast and membrane morphology was photographed. Characteristics of apoptosis are clearly visible: blebs, rounding cells (magnification $\times 200$).

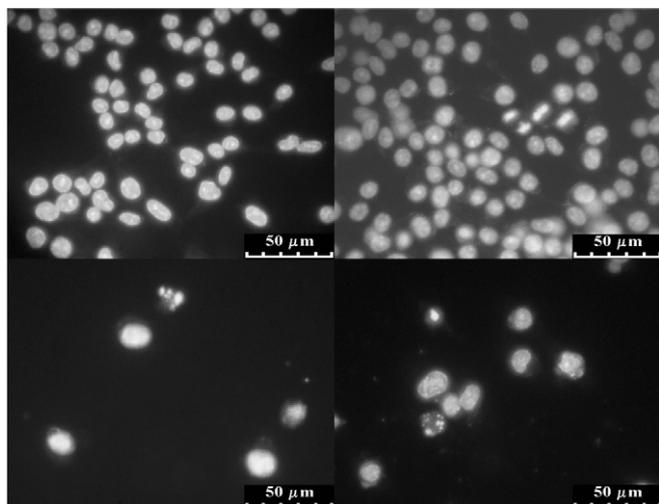


Fig. 5. Cells treated with thiosemicarbazones exhibit nuclear changes characteristic of apoptosis. RT2 (left) and T98 (right) cells were treated with H2Ac4oCIPh (10^{-6} mol L $^{-1}$, bottom) or diluent (top). After 48 h treatment cells were fixed and stained with DAPI. Chromatin condensation and nuclear fragmentation can be observed (Magnification $\times 400$).

Attempting to establish some correlation between stereo-electronic parameters and biological activity, we built a simple correlation matrix (data not shown) considering the possibility of existence of the *E* and *Z* isomers. We found distinct correlations between stereo-electronic parameters and activity against RT2 and T98 cells suggesting that the mechanisms of cytotoxic action are different in the two cell lines.

There is reasonable correlation between molecular area ($R = -0.78$ and $R = -0.76$ for *E* and *Z* isomers, respectively) and the activity against RT2 cells. Likewise there is a correlation between molecular volume ($R = -0.81$ and $R = -0.79$ for *E* and *Z* isomers, respectively) and activity against the same cell line.

Concerning correlation between the properties and activity against T98 cells, we found that there is a correlation between HOMO energy ($R = -0.89$ and $R = -0.88$ for *E* and *Z* isomers, respectively) and activity against this cell line. Since there is an inverse correlation, lower values of HOMO energy contribute to higher cytotoxic activity. Comparison of HOMO density plots for all *E* isomers (Fig. 6) shows distinct electronic delocalization among the studied thiosemicarbazones, which may partially account for the difference in the biological activity of these compounds, although other parameters may not be excluded. There is still a reasonable correlation between PSA ($R = -0.75$ and $R = -0.72$ for *E* and *Z* isomers, respectively) and activity against T98 cells suggesting that the lowest hydrogen bonding ability of the compounds the highest the cytotoxic activity.

Table 5

Cytotoxic effect of 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazone on glioma cells and their haemolytic activity.

Compound	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		Haemolytic activity (mol L ⁻¹)
	T98	RT2	
H2Ac4oT	0.034 ± 0.003	0.014 ± 0.007	>10 ⁻³
H2Ac4mT	0.050 ± 0.018	0.024 ± 0.012	>10 ⁻³
H2Ac4pT	0.037 ± 0.003	0.017 ± 0.011	>10 ⁻³
H2Ac4Ph	0.0068 ± 0.0008	0.0014 ± 0.0008	>10 ⁻³
H2Ac4oCIPh	0.0011 ± 0.00096	0.0014 ± 0.0003	>10 ⁻³
H2Ac4mCIPh	0.0010 ± 0.0004	0.009 ± 0.003	>10 ⁻³
H2Ac4pCIPh	0.0059 ± 0.0008	0.0037 ± 0.0002	>10 ⁻³
Cisplatin	17 ± 1	5 ± 3	>10 ⁻³

The above mentioned results indicate that stereo properties are critical to define the potential activity of the studied compounds against the RT2 cell line, while electronic features seem to be important for interaction with the biological target in T98 cells.

3. Conclusions

RDR contains two different homodimeric subunits consisting of two components, R1 and R2. Recently, a new protein p53-induced gene with high similarity to the R2 subunit (p53R2) was identified. Mutations in p53 or the pathway that directly regulates it have been found in over 80% of human tumors [23].

Glioma cells express wild-type p53 protein. Apoptosis of these cells is triggered primarily by a p53 pathway, evidencing that RT2 cells have functional p53 protein. It has been shown that cells with mutant or absent p53 are less sensitive than cells with wild-type p53 to the majority of clinically used anticancer agents, including DNA alkylating agents [24].

Although the studied compounds proved in general to be more active against RT2 cells, they were all highly active against both tumor cell lineages, as previously observed for another family of thiosemicarbazones [17]. Therefore, as before, we may suggest that the studied thiosemicarbazones can activate apoptotic cell death pathways by mechanisms that are both dependent and independent of p53, and can probably recruit more than one pathway to trigger cell death.

The high cytotoxic activity of the studied compounds against glioma cells at nanomolar doses suggests that they are promising as novel drug candidates for the treatment of brain tumors.

4. Experimental

4.1. Chemicals

2-Acetylpyridine, hydrazine dihydrate, *p*-tolyl, *m*-tolyl, *o*-tolyl, *p*-chlorophenyl, *m*-chlorophenyl and *o*-chlorophenyl isothiocyanate were purchased from Aldrich and used as received. The 2-acetylpyridine thiosemicarbazones were prepared as previously described [19].

4.2. Physical measurements

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) spectrometer using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference.

4.3. Crystal structures determination

Suitable crystals for X-ray diffraction of H2Ac4oT and H2Ac4oCIPh, H2Ac4mCIPh, H2Ac4pCIPh were mounted on a glass fiber. Data were collected at room temperature on a SIEMENS diffractometer and on an Oxford-Diffraction GEMINI diffractometer. Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structures were solved by direct methods and refined on F^2 by full-matrix least-squares using the SHELX-97 [25,26] program in a WinGX system [27]. The crystals data, data collection procedures, structure determination methods and refinement results are summarized in Table 1.

Although some of the hydrogen atoms could be identified in a Fourier difference map, in the final model they were geometrically positioned and refined using a riding model. All non-H atoms were refined anisotropically. Molecular graphics and packing figures were obtained from Ortep [28] and Mercury [29], respectively.

Table 6
Experimental pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) values for 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones against T98 and RT2 glioma cells and calculated stereo and electronic parameters.

Compound	pIC_{50} T98	pIC_{50} RT2	<i>E</i> isomer						<i>Z</i> isomer					
			E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	Area (Å ²)	Volume (Å ³)	Dipole (db)	PSA (Å ²)	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	Area (Å ²)	Volume (Å ³)	Dipole (db)	PSA (Å ²)
H2Ac4oT	7.47	7.85	-8.11	1.96	318.75	291.86	7.13	31.14	-7.8	1.82	315.9	291.02	8.56	28.58
H2Ac4mT	7.30	7.62	-8.12	1.91	318.37	291.80	6.68	31.37	-7.83	1.76	314.89	290.79	8.19	28.36
H2Ac4pT	7.43	7.77	-8.06	1.95	319.29	291.92	6.89	31.79	-7.76	1.79	315.72	290.00	8.2	28.87
H2Ac4Ph	8.17	8.85	-8.14	1.91	298.78	273.60	7.02	31.52	-7.87	1.75	295.15	272.58	8.54	28.45
H2Ac4oClPh	9.00	8.85	-8.32	1.89	311.95	286.86	5.35	30.07	-8.02	1.73	309.33	286.03	7.13	27.63
H2Ac4mClPh	9.00	8.05	-8.37	1.74	313.15	286.95	9.01	30.88	-8.08	1.63	310.46	286.11	10.89	28.32
H2Ac4pClPh	8.23	8.43	-8.33	1.74	313.35	287.00	7.92	30.95	-8.05	1.62	310.59	286.13	10.58	28.33

4.4. Cell lines and culture conditions

Malignant RT2 (wild-type) and T98 (mutant p53) glioma cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (50 U mL⁻¹ penicillin/50 μM streptomycin), in a water jacketed incubator with humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air at 37 °C. For all experiments, cells were seeded in 96-well plates, at a density of 1000 cells/well. After 24 h incubation cells were treated.

4.5. Cytotoxic activity

To determine the IC₅₀ values the cytotoxic effects were quantified using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay [30]. Briefly, logarithmic phase glioma cells were treated with increasing concentrations (10⁻¹²; 10⁻¹¹; 10⁻¹⁰; 10⁻⁹; 10⁻⁸; 10⁻⁷; 10⁻⁶; 10⁻⁵; 10⁻⁴ mol L⁻¹) of either cisplatin (positive control) or test compounds. Drugs were previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentrations were adjusted in DMEM in such manner that final DMSO concentration was lower than 0.5%. Following 48 h treatment, MTT reagent was added to each well. Following another 4 h of incubation at 37 °C, DMSO was added to each well to dissolve

formazan precipitates and absorbance was measured at 570 nm. Tests using DMSO (0.5% in DMEM) as negative control were carried out in parallel. All tests were performed in triplicates with full agreement between the results. Statistical analysis was carried out by the unpaired, one-tailed Student's *t* test.

4.6. Morphological analysis of tumor cells

For phase contrast microscopy, representative fields of cells were photographed using a TS100 (Nikon) microscope. Cells stained with DAPI were visualized using suspensions of treated or control cells placed in tissue culture dishes. Cells were fixed with methanol, rinsed with PBS and methanol, stained with DAPI in methanol, and observed using fluorescence microscopy (Nikon) under UV illumination.

4.7. SAR studies

Computational analyses were performed using Spartan'08 software (Wavefunction, Inc., USA) and all initial structures were built using atoms and structural fragments from their molecular editor. These structures were built considering the possibility of existence of *E* and *Z* isomers. Structures were minimized and conformational analysis was performed in gas phase using Merck molecular force field (MMFF) [31]. A torsion angle increment of 30 degrees was performed only in N1–C2–C7–N2 (θ_1) and C8–N4–C9–C10 (θ_2) dihedral angles because X-ray diffraction data for this class of compounds show that the thiosemicarbazone backbone is planar due to resonance. After conformational analysis, geometry optimization for selected conformations was carried out using the semi empirical Austin Model 1 (AM1) method [32] and *ab initio* calculations were performed at the HF/3-21C* level [33]. HOMO and LUMO energies were obtained after full optimization for the sets of conformations found in the previous step. Dipole moments, polar superficial area (PSA), molecular area, and molecular volumes were also determined.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CNEN, FAPEMIG (CDS APQ-5664-4.04/07) and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

Appendix A. Supplementary material

CCDC reference numbers 782204, 782205, 782206 and 782207 for, H2Ac4mClPh, H2Ac4oClPh, H2Ac4oT and H2Ac4pClPh, respectively contain the supplementary crystallographic data. These data can be obtained free of charge from the CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/datarequest/cif.

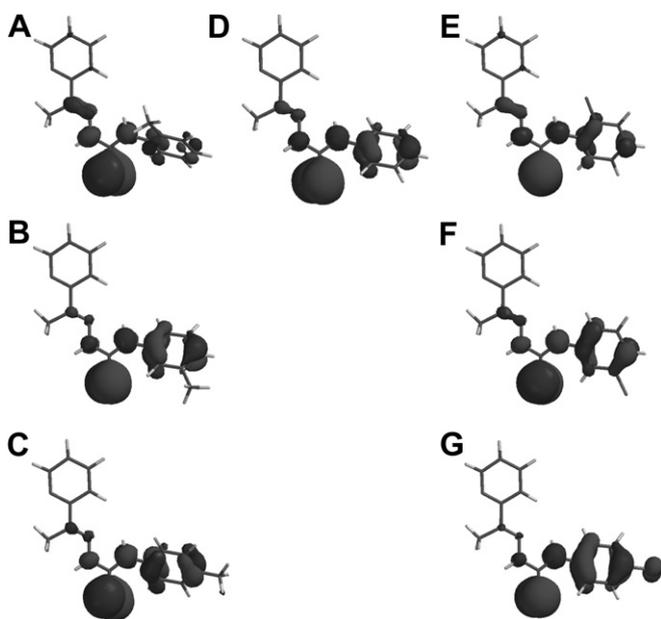


Fig. 6. HOMO density distributions of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: H2Ac4oT (A), H2Ac4mT (B), H2Ac4pT (C), H2Ac4Ph (D), H2Ac4oClPh (E), H2Ac4mClPh (F) and H2Ac4pClPh (G).

References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, The wide pharmacological versatility of thiosemicarbazones, semicarbazones and their metal complexes, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31–39.
- [2] R.A. Finch, M. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y. Cheng, A.C. Sartorelli, Triapine (3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 983–991.
- [3] R.A. Finch, M. Liu, A.H. Cory, J.G. Cory, A.C. Sartorelli, Triapine (3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity, *Adv. Enzyme Regul.* 39 (1999) 3–12.
- [4] I. Gojo, M.L. Tidwell, J. Greer, N. Takebe, K. Seiter, M.F. Pochron, B. Johnson, M. Sznol, J.E. Karp, Phase I and pharmacokinetic study of Triapine[®], a potent ribonucleotide reductase inhibitor, in adults with advanced hematologic malignancies, *Leuk. Res.* 31 (2007) 1165–1173.
- [5] J. Shao, B. Zhou, B. Chu, Y. Yen, Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design, *Curr. Cancer Drug Targets* 6 (2006) 409–431.
- [6] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, S. Lau, P.J. Jansson, D.B. Lovejoy, Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumor agents, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 702–717.
- [7] A.G. Quiroga, J.M. Pérez, E.I. Montero, J.R. Masaguer, C. Alonso, C.J. Navarro-Ranninger, Palladated and platinumated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in *cis*-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA interstrand cross-links by these complexes, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 117–123.
- [8] A.G. Quiroga, C. Navarro-Ranninger, Contribution to the SAR field of metalated and coordination complexes studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs, *C. Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 119–133.
- [9] T. Bal, B. Atasever, Z. Solakoğlu, S. Erdem-Kuruca, B. Ülküseven, Synthesis, characterisation and cytotoxic properties of the N^1, N^4 -diarylidene-*S*-methylthiosemicarbazone chelates with Fe(III) and Ni(II), *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 161–167.
- [10] M.B. Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, A. Bonati, P. Lunghi, S. Pinelli, Synthesis, characterisation, X-ray structure and biological activity of three new 5-formyluracil thiosemicarbazone complexes, *J. Inorg. Biochem.* 83 (2001) 169–179.
- [11] M.X. Li, C.L. Chen, C.S. Ling, J. Zhou, B.S. Ji, Y.J. Wu, J.Y. Niu, Cytotoxicity and structure–activity relationships of four α -*N*-heterocyclic thiosemicarbazone derivatives crystal structure of 2-acetylpyrazine thiosemicarbazone, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2704–2706.
- [12] 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, 2-Benzoylpyridine-*N*(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7138–7144.
- [13] 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, Palladium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: spectral characterization, structural studies and cytotoxic activity, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 698–706.
- [14] A.E. Graminha, C. Rodrigues, A.A. Batista, L.R. Teixeira, E.S. Fagundes, H. Beraldo, Ruthenium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones with cytotoxic activity against human tumor cell lines, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 69 (2008) 1073–1076.
- [15] A.P. Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Structural studies and cytotoxic activity of *N*(4)-phenyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone Sn(IV) complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 467–472.
- [16] D.C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M. Souza-Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3904–3910.
- [17] I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Gallium(III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1870–1877.
- [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, Organotin(IV) complexes of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1454–1461.
- [19] M.C. Miller, C.N. Stineman, J.R. Vance, D.X. West, I.H. Hall, The cytotoxicity of copper(II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-4 *N*-substituted thiosemicarbazones, *Anticancer Res.* 18 (1998) 4131–4139 (and references therein).
- [20] E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Dominguez, R. Carballo, C. Maichle-Moessmer, J. Straehle, D.X. West, Preparation, structural characterization, and antifungal activities of complexes of group 12 metals with 2-acetylpyridine- and 2-acetylpyridine-*N*-oxide-4*N*-phenylthiosemicarbazones, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 625 (1999) 961–968.
- [21] I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Coordination to copper(II) strongly enhances the in vitro antimicrobial activity of pyridine-derived *N*(4)-tolyl thiosemicarbazones, *Polyhedron* 26 (2007) 3263–3270.
- [22] M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391 (1998) 43–50.
- [23] G. Lozano, S.J. Elledge, P53 sends nucleotides to repair DNA, *Nature* 404 (2000) 24–25.
- [24] P.M. O'Connor, J. Jackman, I. Bae, T.G. Myers, S. Fan, M. Mutoh, D.A. Scudiero, A. Monks, E.A. Sausville, J.N. Weinstein, S. Friend, A.J. Fornace Jr., K.W. Kohn, Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res.* 57 (1997) 4285–4300.
- [25] G.M. Sheldrick, SHELXS-97: Program for The 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, WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838.
- [28] L.J. Farrugia, ORTEP-3 for Windows – a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [29] I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M.K. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures, *Acta Crystallogr. B* 58 (2002) 389–397.
- [30] R.I. Freshney, in: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, fourth ed. Wiley-Liss, New York, 2000.
- [31] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart, AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902–3909.
- [32] T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94, *J. Comput. Chem.* 17 (1996) 490–519.
- [33] A.R. Leach, *Molecular Modelling, Principles and Applications*. Longman, Edinburgh, 1998.



Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity

Josane A. Lessa^a, Juliana C. Guerra^b, Luana F. de Miranda^b, Carla F.D. Romeiro^b, Jeferson G. Da Silva^a, Isolda C. Mendes^c, Nivaldo L. Speziali^d, Elaine M. Souza-Fagundes^b, Heloisa Beraldo^{a,*}

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

^b Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Escola de Belas Artes, Departamento de Artes Plásticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2011

Received in revised form 19 August 2011

Accepted 2 September 2011

Available online 10 September 2011

Keywords:

Gold(I) complexes
Thiosemicarbazones
Cytotoxic activity
Thioredoxin reductase

ABSTRACT

Complexes [Au(H₂Ac₄DH)Cl]·MeOH (**1**) [Au(H₂Ac₄Me)Cl]Cl (**2**) [Au(H₂Ac₄Ph)Cl]Cl·2H₂O (**3**) and [Au(H₂Bz₄Ph)Cl]Cl (**4**) were obtained with 2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H₂Ac₄DH), its *N*(4)-methyl (H₂Ac₄Me) and *N*(4)-phenyl (H₂Ac₄Ph) derivatives, as well as with *N*(4)-phenyl 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H₂Bz₄Ph). The compounds were cytotoxic to Jurkat (immortalized line of T lymphocyte), HL-60 (acute myeloid leukemia), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HCT-116 (colorectal carcinoma) tumor cell lines. Jurkat and HL-60 cells were more sensitive than MCF-7 and HCT-116 cells. Upon coordinating to the gold(I) metal centers in complexes (**2**) and (**4**), the cytotoxic activity of the H₂Ac₄Me and H₂Bz₄Ph ligands increased against the HL-60 and Jurkat tumor cell lines. **2** was more active than auranofin against both leukemia cells. Most of the studied compounds were less toxic than auranofin to peripheral blood mononuclear cells (PBMC). All compounds induced DNA fragmentation in HL-60 and Jurkat cells indicating their pro-apoptotic potential. Complex (**2**) strongly inhibited the activity of thioredoxin reductase (TrxR), which suggests inhibition of TrxR to be part of its mechanism of action.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cisplatin and the second generation complexes carboplatin and oxaliplatin are effective antitumor agents widely used in the treatment of testicular, ovarian, bladder and a variety of other solid tumors. Despite the clinical success of cisplatin, many tumors are intrinsically resistant to the drug, and tumors that are initially sensitive to cisplatin treatment often develop resistance during ongoing treatment regimens [1]. In addition, the compounds cause severe side effects which complicate their clinical application. Hence there is an increasing demand for novel metal-based-pharmaceuticals with a mode of action differing from that of the platinum generation of anticancer drugs [2].

Gold complexes have attracted significant attention as potential alternatives to cisplatin due to the fact that many gold(I) and gold(III) compounds have been found to inhibit tumor cell growth. Since gold compounds have been observed to interact with numerous intracellular protein targets (e.g., cathepsins, tyrosine phosphatases, cyclooxygenases, thioredoxin reductase, proteasomes, etc.), they have potential in treating cisplatin-resistant tumors [3]. The

anti-rheumatic drug triethylphosphinegold(I)tetraacetylthioglucose (auranofin) emerged as the lead compound for the class of anti-proliferative gold compounds [4].

The selenoenzyme thioredoxin reductase (TrxR) is considered as an emerging target for anticancer metallodrugs. Gold(I) and gold(III) complexes have shown promising anti-proliferative activity and demonstrated a significant potential as new anticancer agents. It has been suggested that the mechanism of action of these compounds involves targeting thioredoxin reductase [5]. TrxR is relevant for the proliferation of tumor tissues and its inhibition is related to the triggering of anti-mitochondrial effects [6].

Thiosemicarbazones are a class of compounds with wide pharmacological versatility, which exhibit antiviral, antitumor and antimicrobial activities [7]. The antitumor activity of $\alpha(N)$ -heterocyclic thiosemicarbazones has been attributed to their ability to inhibit ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), a key enzyme in DNA biosynthesis, which catalyzes the synthesis of deoxyribonucleotides from their ribonucleotide precursors [8]. The antitumor properties of thiosemicarbazones [7,9] and their metal complexes [7,8,10–13] have been extensively investigated. Gold(I) [14] and gold(III) complexes [15] with thiosemicarbazones have been prepared and tested for their *in vitro* cytotoxic activity against tumor cell lines. However to our knowledge studies on gold complexes with thiosemicarbazones have not involved investigation on their interaction with TrxR.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095740; fax: +55 31 34095700.
E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

In the present work gold(I) complexes with 2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4DH), its *N*(4)-methyl (H2Ac4Me) and *N*(4)-phenyl (H2Ac4Ph) derivatives, as well as with *N*(4)-phenyl 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H2Bz4Ph) (see Fig. 1) were tested for their cytotoxic activity against human leukemia and solid tumor cell lines. Since thioredoxin reductase (TrxR) is considered as the most relevant molecular target for gold compounds, inhibition of TrxR's activity by the studied gold(I) complexes was investigated.

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 (400–170 cm⁻¹). NMR spectra were obtained with a Bruker AVANCE DPX 200 (200 MHz) spectrometer using CD₃OD-*d*₄ as the solvent and TMS as internal reference.

2.2. Synthesis of 2-acetylpyridine thiosemicarbazone (H2Ac4DH), its *N*(4)-methyl (H2Ac4Me) and *N*(4)-phenyl (H2Ac4Ph) derivatives and *N*(4)-phenyl 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H2Bz4Ph)

All thiosemicarbazones were prepared as previously described [16].

2.3. Synthesis of the gold(I) complexes

The gold complexes were obtained by mixing a methanol/acetone (1:1) solution of the desired thiosemicarbazone (1 mmol) with hydrogen tetrachloroaurate(III) (HAuCl₄·3H₂O) in 1:1 ligand-to-metal molar ratio at room temperature with stirring for 2 h (see Scheme 1). The resulting solids were filtered off then washed with acetone and dried *in vacuo*.

2.3.1. [(2-acetylpyridine thiosemicarbazone)chlorogold(I)], [Au(H2Ac4DH)Cl]·MeOH (**1**)

Light-Brown solid. Anal. Calc. (C₉H₁₄ClN₄SOAu): C, 23.56; H, 3.08; N, 12.21%; Found: C, 23.84; H, 3.05; N, 12.07%. FW: 458.72 g.mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): 3284 medium (m), 3240 m v(NH), 3100v(OH), 1623 strong (s) v(C=N), 775 m v(C=S), 621weak (w) ρ(py). IR (CsI/nujol, cm⁻¹): 348w v(Au-S), 330w v(Au-Cl). ¹H NMR [200 MHz, CD₃OD-*d*₄, δ (ppm), δ (ppm) free ligand in parenthesis]:

8.92 (8.56) [doublet (d), 1H, H6]; 8.46 (8.17) [d, 1H, H3]; 8.67 (7.82) [triplet (t), 1H, H4]; 8.07 (7.38) [t, 1H, H5]; 2.57 (2.40) [singlet (s), 3H, CH₃]. Λ_M = 49.73 Ω⁻¹. cm². mol⁻¹ in dimethylformamide (DMF). Yield 58%.

2.3.2. [(*N*(4)-methyl 2-acetylpyridinium thiosemicarbazone)chlorogold(I)] chloride, [Au(H2Ac4Me)Cl]Cl (**2**)

Rust colored solid. Anal. Calc. (C₉H₁₃Cl₂N₄SAu): C, 22.65; H, 2.75; N, 11.74%. Found: C, 22.91; H, 2.68; N, 11.51%. FW: 477.16 g.mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): 3284 m v(NH), 2910 v(N_{py}⁺H), 1623 v(C=N), 775 m v(C=S), 622w ρ(py). IR (CsI/nujol, cm⁻¹): 362w v(Au-S), 344w v(Au-Cl). ¹H NMR [200 MHz, CD₃OD-*d*₄, δ (ppm), δ (ppm) free ligand in parenthesis]: 9.00 (8.53) [d, 1H, H6]; 8.22 (8.17) [d, 1H, H3]; 8.47 (7.80) [t, 1H, H4]; 7.96 (7.35) [t, 1H, H5]; 3.15 (3.14) [s, 3H, CH₃]; 2.67 (2.36) [s, 3H, CH₃]. Λ_M = 127.42 Ω⁻¹. cm². mol⁻¹ in DMF. Yield 65%.

2.3.3. [(*N*(4)-phenyl 2-acetylpyridinium thiosemicarbazone)chlorogold(I)] chloride dihydrate, [Au(H2Ac4Ph)Cl]Cl·2H₂O (**3**)

Dark red solid. Anal. Calc. (C₁₄H₁₉O₂Cl₂N₄SAu): C, 29.23; H, 3.33; N, 9.74%. Found: C, 29.36; H, 3.11; N, 9.54%. FW: 575.26 g.mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): 3230 m v(NH), 2920 v(N_{py}⁺H), 1619 s v(C=N), 797 m v(C=S), 602w ρ(py). IR (CsI/nujol, cm⁻¹): 370w v(Au-S), 363w v(Au-Cl). ¹H NMR [200 MHz, CD₃OD-*d*₄, δ (ppm), δ (ppm) free ligand in parenthesis]: 9.08 (8.60) [d, 1H, H6]; 8.34 (8.20) [d, 1H, H3]; 8.55 (7.88) [t, 1H, H4]; 8.04 (7.38) [t, 1H, H5]; 2.79 (2.47) [s, 3H, CH₃]. Λ_M = 90.29 Ω⁻¹. cm². mol⁻¹ in DMF. Yield 85%.

2.3.4. [(*N*(4)-phenyl 2-benzoylpyridinium thiosemicarbazone)chlorogold(I)] chloride [Au(H2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**)

Dark red solid. Anal. Calc. (C₁₉H₁₇Cl₂N₄SAu): C, 37.95; H, 2.85; N, 9.32%; Found: C, 37.73; H, 2.74; N, 9.31%. FW: 601.30 g.mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): 3226 m v(NH), 2682 v(N_{py}⁺H), 1618 s v(C=N), 778 m v(C=S), 615w ρ(py). IR (CsI/nujol, cm⁻¹): 369w v(Au-S), 351w v(Au-Cl). ¹H NMR [200 MHz, CD₃OD-*d*₄, δ (ppm), δ (ppm) free ligand in parenthesis]: 9.15 (8.65, *E*; 8.84, *Z*) [d, 1H, H6]; 7.76 (7.75–7.50, *E*, *Z*) [d, 1H, H3]; 8.41(7.83, *E*; 7.95, *Z*) [t, 1H, H4]; 8.02 (7.28–7.12, *E*, *Z*) [t, 1H, H5] [s, 1H, H15]. Λ_M = 111.95 Ω⁻¹. cm². mol⁻¹ in DMF. Yield 60%.

2.4. X-ray crystallography

Crystals of [Au(H₂Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**) and [Au(H₂Bz4Ph)Cl]Cl (**4**) were isolated from the filtrate in the syntheses of complexes (**1**) and (**4**). Structures of **1a** and **4** were determined using single-crystal X-ray diffraction. The measurements were carried out on an Oxford-GEMINI diffractometer with graphite monochromated Mo-K

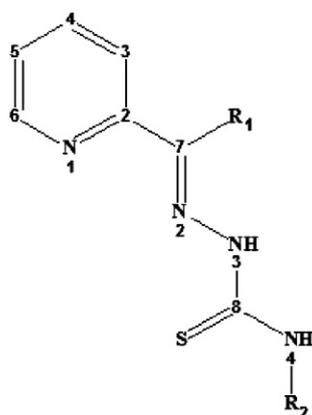
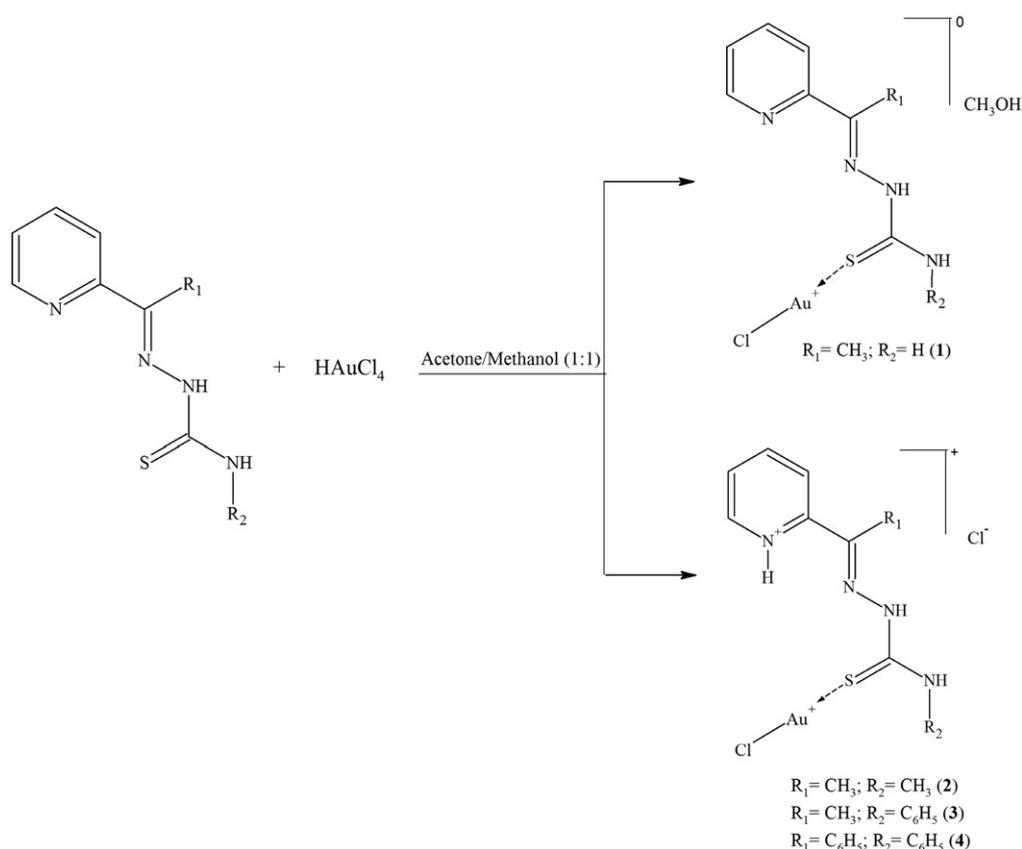


Fig. 1. Generic representation for pyridine-derived thiosemicarbazones.

Thiosemicarbazone	R ₁	R ₂
H2Ac4DH	CH ₃	H
H2Ac4Me	CH ₃	CH ₃
H2Ac4Ph	CH ₃	C ₆ H ₅
H2Bz4Ph	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅



Scheme 1. Synthesis of complexes (1–4).

radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at 293(2) K. Data collection, cell refinement, and data reduction were performed using the CRYCALISPRO software [17,18]. A semi-empirical absorption correction method was applied [17,18]. The structures were solved using SHELXS-97 [19] and refined using the SHELXL-97 software [19]. 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, with exception of the water molecule of **1a**; in this case, the hydrogen atom positions were refined using the 'DFIX' command, with a separation of 1.38 \AA , the HO distance constrained to 0.82 \AA and $U_{\text{iso}} = 1.5U_{\text{eq}}(\text{O})$. Crystal data, data-collection parameters, and structure-refinement results are summarized in Table 1.

2.5. Cytotoxic activity

2.5.1. Materials

Cisplatin, auranofin, (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT), RPMI-1460, L-glutamine were purchased from Sigma, and Antibiotic/Antimycotic Solution and fetal calf serum were purchased from Gibco (Grand Island, NY).

2.5.2. Cell lines

Jurkat (human immortalized line of T lymphocyte), HL-60 (wild type human promyelocytic leukemia), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) cell lines were kindly given by Dr. Gustavo Amarante-Mendes (São Paulo University, Brazil). All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640 medium supplemented with 100 U.mL^{-1} penicillin and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of L-glutamine and 10% of fetal bovine serum. All cultures were maintained at 37°C in a humidified

Table 1

Crystal data and structure refinement for $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac4DH})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1a**) and $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz4Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**4**).

Compound	$[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac4DH})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1a)	$[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz4Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4)
Empirical formula	$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{AuCl}_2\text{N}_4\text{OS}$	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{SAu}$
Formula weight	481.15	601.29
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P 21/n	P 21/c
Wavelength, Å	0.71073	0.71073
Unit cell dimensions		
a, Å	8.2261(2)	13.2675(2)
b, Å	15.5254(3)	6.8000(2)
c, Å	10.7882(3)	22.9706(5)
α , $^\circ$	90	90
β , $^\circ$	96.523(2)	93.175(2)
γ , $^\circ$	90	90
Volume, Å^3	1368.88(6)	2069.20(8)
Z/density calc., Mg/m^3	4 / 2.335	4 / 1.930
Absorption coefficient, mm^{-1}	11.279	7.480
F(000)	904	1152
Crystal size, mm	$0.38 \times 0.12 \times 0.06$	$0.24 \times 0.16 \times 0.10$
θ range for data coll., $^\circ$	2.81 to 29.52	3.08 to 29.51
Index range	$-10 \leq h \leq 10$ $-19 \leq k \leq 19$ $-13 \leq l \leq 13$	$-18 \leq h \leq 16$ $-7 \leq k \leq 9$ $-28 \leq l \leq 24$
Completeness	99.9 (to 26.37°)	86.4 (to 29.51°)
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	Full-matrix least-squares on F^2
Extinction coefficient	None	0.00055(6)
Goodness-of-fit on F^2	0.986	0.887
Reflec. collect./unique $[R_{\text{int}}]$	16341 / 2796 $[R(\text{int}) = 0.0881]$	11961 / 4986 $[R(\text{int}) = 0.0214]$
Data/restraints/parameters	2796 / 3 / 161	4986 / 0 / 244
Final R indices $[I > 2\sigma(I)]$	$R_1 = 0.0282$ $wR_2 = 0.0654$	$R_1 = 0.0238$ $wR_2 = 0.0417$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0354$ $wR_2 = 0.0668$	$R_1 = 0.0412$ $wR_2 = 0.0434$
Larg. peak & hole, $\text{e} \text{ \AA}^{-3}$	0.577 and -0.969	0.631 and -0.832

incubator with 5% CO₂ and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

2.5.3. Evaluation of the cytotoxic effect against human tumor cell lines

Jurkat and HCT-116 lineages were inoculated at 100,000 cells of per well, while HL-60 and MCF-7 were inoculated at 50,000 and 40,000 cells of per well, respectively. The plates were pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells prior to the addition of the test compounds. Freshly prepared solutions of the different compounds were tested at 10 μM. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5% CO₂ and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.1% DMF (negative control) and 10 μM of cisplatin and auranofin (positive controls). Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT. All substances were dissolved in DMF prior to dilution.

Compounds that inhibited the proliferation in more than 50% were selected for determination of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). IC₅₀ values were determined over a range of concentrations (100–0.01 μM). All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

2.5.4. Evaluation of the cytotoxic effect against human peripheral blood mononuclear cells

The human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated according to the method described by Gazzinelli et al. [20]. In brief, PBMC samples were obtained through agreement with Minas Gerais Hematology and Hemotherapy Center Foundation – HEMOMINAS (protocol n° 105/2004) from healthy adult volunteers of both sexes by centrifugation of heparinized venous blood over Ficoll cushion (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Mononuclear cells were collected from the interphase after Ficoll separation and washed three times in RPMI-1640 before further processing. The cells were washed and the cell density was adjusted to 2.5×10^6 cells.mL⁻¹. 100 μL of this suspension (250,000 cells) were added to 96-well plate and incubated for 24 h in the presence of 2.5 μg.mL⁻¹ of phytohemagglutinin (PHA) for stabilization. After this period, cells were incubated in the presence of different concentrations of selected compounds (from 100 to 0.00001 μM) for 48 h, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were maintained in culture medium containing RPMI (Sigma) supplemented with 5% normal human serum AB Rh+, previously inactivated, 2 mM L-glutamine and an antibiotic/anti-mycotic solution containing 1000 U/mL penicillin, 1000 μg/mL streptomycin and 25 μg/mL fungisone (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) was added to control fungal and bacterial contamination.

All experiments were performed in triplicate using auranofin as positive control. We conducted a solvent control (DMF) at the same concentration of the tested samples (less than 0.5%). Proliferation and viability were evaluated by the MTT assay.

2.5.5. In vitro cell viability assay – MTT assay

The MTT assay is a standard colorimetric assay, in which mitochondrial activity is measured by splitting tetrazolium salts with mitochondrial dehydrogenases in viable cells only [21]. Briefly, after 4 h of the end of incubation of cells with different compounds, 20 μL of MTT solution (2.5 mg.mL⁻¹ in phosphate-buffered saline) were added to each well, the supernatant was removed and 200 μL of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The optical densities (OD) were measured in a spectrophotometer at 570 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, comparing with 0.1% DMF control and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD treated – mean OD background) / mean OD untreated cultured, i.e. 0.1% DMF – mean OD blank wells) × 100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations

between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative [22].

2.5.6. DNA fragmentation assay

The sub-diploid DNA content was determined for the quantification of cellular DNA fragmentation, which is characteristic of apoptosis. This experiment was used as a predictive method of the pro-apoptotic potential of the compounds. The sub-diploid DNA content was evaluated in HL-60, Jurkat, MCF-7 and HCT cells subjected to different treatments with selected compounds, according to the method described by Nicoletti et al. [23]. For this study, 200,000 cells in suspension treated or not with compounds were centrifuged for 5 min at 200 g, 4 °C. After centrifugation cells were re-suspended in hypotonic fluorochrome solution-HFS (50 μg.mL⁻¹ propidium iodide – PI (Sigma), 0.1% sodium citrate (Sigma) and 0.1% Triton X-100 (Sigma)). The samples in HFS were incubated at 8 °C for 4–8 h and immediately taken to the flow cytometer.

Incubation of cells with a hypotonic fluorochrome solution (HFS) leads to the weakening of the cell membrane by the action of Triton-X100 and hypotonic shock causes its lysis. The nuclear material becomes accessible to PI, which will intercalate in nuclear DNA. Normal cells have DNA content equal to 2n or 4n, depending on the phase of the cell cycle. In apoptotic cells the DNA content is lower than 2n, because the fragments of small molecular weight leave the inner core, which is the sub-diploid phase. The sub-diploid DNA content was determined by the CellQuest program (Becton Dickinson).

2.5.7. Statistical analysis

All experiments were performed in at least three replicates per compound and results shown are the average of three independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Significance was tested by the Student's t-test.

2.6. Studies of interactions with supercoiled plasmid DNA

Agarose gel electrophoresis was carried out to identify the modifications resulting from the interaction of complexes with DNA. Thus, 100 ng of purified pGEM®-T plasmid DNA (Promega-USA) were incubated with compounds (H2Ac4Me, **2**, HAuCl₄ and auranofin) at the same concentration (100 μM) in Tris-HCl buffer (NaCl 50 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.2). The mixture was incubated at 37 °C for 24 h. Thereafter, the reactions were quenched by adding 5 μL of a loading buffer solution (50 mM Tris, pH 7.2, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol, and 250 mM EDTA). The samples were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in 0.5 X TBE buffer for 1 h at 75 mV. The gel was stained after electrophoresis in 0.5 X TBE buffer with 2.5 μg mL⁻¹ ethidium bromide for 15 min and visualized by UV light.

2.7. Inhibition of thioredoxin reductase (TrxR) activity

Rat liver TrxR (Sigma) was used to determine TrxR inhibition by the compounds. The assay was performed according to the manufacturer's instructions (Sigma product information sheet T9698) and Ott and co-workers [24] with appropriate modifications. Initially, the TrxR rat liver solution was diluted with 1.0 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. To 20 μL aliquots of this solution (each containing approximately 0.10 units of the enzyme) 20 μL of a solution of complex (**2**) in 5% DMF/potassium phosphate buffer pH 7.0 (in ten different concentrations in the 0.05–50.0 μM range) or vehicle without compound (control) were added, and the resulting solutions were incubated for 1 h at 37 °C with moderate shaking. For H2Ac4Me, HAuCl₄ and auranofin the experiments were performed at 0.5, 5.0 and 10.0 μM in order to compare their inhibitory activities with that of complex (**2**). The solutions were transferred quantitatively to 96-well plates, and to each well 200 μL of reaction mixture (10 mL of

reaction mixture consisted of 1.0 mL of 1.0 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.20 mL of 500 mM EDTA solution pH 7.5, 0.80 mL of 63 mM dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) in ethanol, 0.10 mL of 20 mg/mL bovine serum albumin, 0.05 mL of 48 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and 7.85 mL of water) were added.

To correct for non-enzymatic product formation, 40 μL of 2.5% DMF potassium phosphate buffer 1.0 M, pH 7.0, and 200 μL of reaction mixture were processed simultaneously (blank). After proper mixing the formation of 5-thionitrobenzol (TNB) was monitored in a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum) at 412 nm in 2 s intervals for 4 min. The absorbance of the blank was subtracted from that of the control and treated wells. The enzymatic activity was calculated as the maximum absorbance observed in 4 min in each well. The experiments were performed in triplicate. The EC_{50} value was calculated as the concentration of complex (2) decreasing the enzymatic activity by 50%.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the gold(I) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of gold(I) complexes $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH})\text{Cl}]\cdot\text{MeOH}$ (1) $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Me})\text{Cl}]\text{Cl}$ (2) $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3) and $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4). In complex (1) a neutral thiosemicarbazone ligand ($\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH}$) is attached to the metal center together with a chloride. In 2–4 there is one positively charged thiosemicarbazone ($\text{H}_2\text{Ac}_4\text{R}$, R = methyl, phenyl; $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph}$) and one chloride as ligands and a chloride acts as counter ion, as confirmed by the crystal structure of 4 which reveals that the pyridine nitrogen is protonated (see Section 3.3).

Reduction of gold(III) to gold(I) took place in all cases, as observed for other gold complexes with thiosemicarbazones [25]. Reduction of gold(III) by the thiosemicarbazones could occur considering that these compounds exhibit reducing properties as previously shown by previous reports [26]. However, since we obtained the complexes in good yields reduction of gold(III) with oxidation of methanol could also take place. In complex (1) a crystallization methanol molecule is present as confirmed by its thermo-gravimetric curve which shows a weight loss of 7.3% (calcd 7.0%). In complex (3) two crystallization water molecules are present as shown by its thermo-gravimetric curve which reveals a weight loss of 6.1% (calcd. 6.3%). The presence

of solvation molecules in 1 and 3 was also corroborated by their infrared spectra (see Section 3.2).

3.2. Spectroscopic characterization

The $\nu(\text{C}=\text{S})$ vibration observed at $802\text{--}755\text{ cm}^{-1}$ in the infrared spectra of the free thiosemicarbazones shifts to $797\text{--}775\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of 1–4, indicating coordination of a thione sulfur [27]. A fairly strong and very broad absorption band observed at $2920\text{--}2682\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of complexes (2–4) was attributed to the $\nu(\text{N-H}^+)$ stretching vibration of the pyridinium group [28]. Absorptions observed at $370\text{--}348\text{ cm}^{-1}$ were assigned to the $\nu(\text{Au-S})$ vibration [14]. In addition, an absorption attributed to the $\nu(\text{Au-Cl})$ vibration was observed at $363\text{--}330\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of 1–4 [29]. A broad absorption at $3200\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ in the spectrum of complex (1) and at 3370 cm^{-1} in the spectrum of complex (3) was attributed to the $\nu(\text{O-H})$ vibration.

Although all thiosemicarbazones and gold(I) complexes were soluble in $\text{DMSO-}d_6$ the complexes reacted with the solvent. Thus the NMR spectra of all studied compounds were recorded in methanol- d_4 .

The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. We did not obtain ^{13}C NMR spectra of 1–4 due to their low solubility in methanol- d_4 . Only one signal was observed for each hydrogen in the ^1H NMR spectrum of all acetylpyridine-derived thiosemicarbazones, indicating the presence of only the *E* configurational isomer in solution [9]. The spectrum of $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph}$ shows duplicated signals indicating the presence of the *Z* and *E* isomers in solution (50% each isomer). In complexes (1–4) the signals of all hydrogens undergo significant shifts in relation to their positions in the free bases (see Section 2.3). In the spectra of complexes (1–4) only one signal was observed for each hydrogen, suggesting the presence of only one isomer. The crystal structures of $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1a) and $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4) reveal that the thiosemicarbazones adopt the *E* configuration (See Section 2.3).

3.3. X-ray crystallography

In complexes (1a) and (4) gold(I) is coordinated by the sulfur from the thiosemicarbazone together with a chloride ion in a distorted linear environment (see Fig. 2), which is typical of gold(I) complexes [14,30,31]. Other works report crystal structures of gold(I) complexes with thiosemicarbazones [14,30,31] which contain the metal center attached either to two sulfurs [30,31] or to a sulfur and

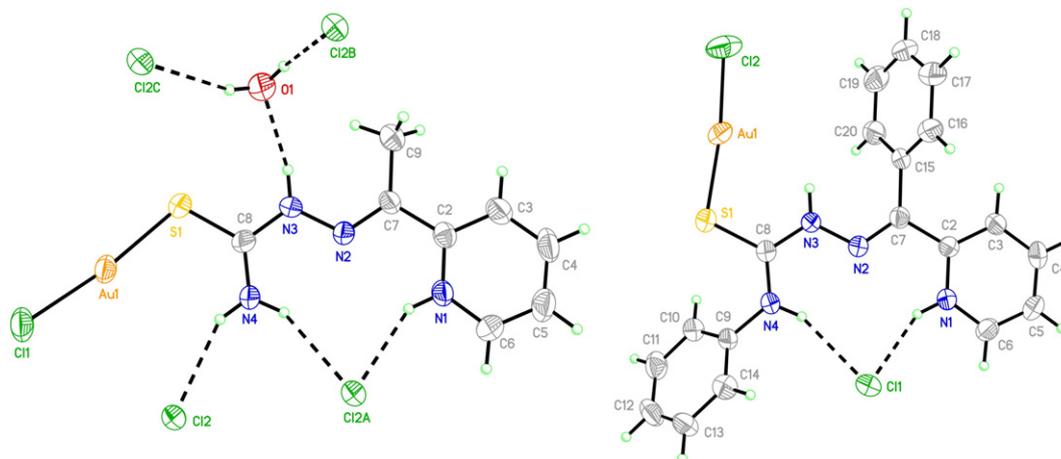


Fig. 2. Molecular plot of $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{DH})\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1a, left) and $[\text{Au}(\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph})\text{Cl}]\text{Cl}$ (4, right) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level. Intermolecular interactions via hydrogen bond are presented in dashes. In 1a, the Cl2A, Cl2B and Cl2C atoms were generated by symmetry transformations.

a phosphine [14]. To our knowledge this is the first report on complexes containing the gold center attached to a sulfur and a chloride as ligands.

The crystallographic data confirm reduction of gold(III) during the synthesis. In both complexes the thiosemicarbazone is protonated at the pyridine nitrogen. Thus, although complex (1) presents a neutral thiosemicarbazone in the powder, in **1a**, obtained from the filtrate, the thiosemicarbazone is protonated at the pyridine nitrogen, like in complexes (2–4), as a consequence of the presence of acidic hydrogen tetrachloroaurate in the reaction medium.

Lengthening of the S1–C8 bond from 1.681(3) Å in [H₂2Ac4DH]Cl (a thiosemicarbazone hydrochloride containing the pyridinium group) [32] to 1.712(5) Å in **1a** and from 1.663(2) Å in H2Bz4Ph [33] to 1.701(3) Å in **4**, together with the shortening of the N3–C8 bond from 1.371(3) Å in [H₂2Ac4DH]Cl [32] to 1.345(6) Å in **1a** and from 1.360(2) Å in H2Bz4Ph [33] to 1.345(3) Å in **4**, were noticed. The observed S1–C8 bond lengthening is compatible with coordination of a thione sulfur and is less than the lengthening observed upon coordination of thiosemicarbazones to gold(I) through a thiolate sulfur [34]. Selected bond lengths and angles are shown in Tables 2 and 3.

In **1a** and **4** the thiosemicarbazone adopts the *EE* conformation in relation to the C7=N2 and N3–C8 bonds. This conformation is the same as that observed for [H₂2Ac4DH]Cl [32]. In contrast, H2Bz4Ph presents *ZE* conformation [33]. In fact, the N1H...Cl and N4H...Cl hydrogen bonds in the structure of [H₂2Ac4DH]Cl were also observed for **1a** and **4** (See Table 4), suggesting that these hydrogen bonds favor the adoption of the *EE* conformation (See Table 4 and Fig. 2).

The N3C8S1Au1 torsion angles were 171.62° and 124.46° for **1a** and **4**, respectively. This difference is related to the N3...O hydrogen bond in **1a**, which is absent in **4** and to the presence of the bulky *N*(4)-phenyl substituent in **4**, which causes steric hindrance with the Au1Cl group (See Fig. 2).

In a previously reported work the Au(I)–S bond distance was 2.319 (1) for a complex containing a thiosemicarbazone and a phosphine as ligands [14]. In gold(I) complexes containing two thiosemicarbazones this distance was 2.2825(13) and 2.2818(13) [31]. In complexes (**1a**) and (**4**) the Au(I)–S bond distances are 2.2523(13) and 2.2539(8), respectively. These differences could probably be attributed to the stronger bonds between gold and phosphine [14] or sulfur [31] in the previously reported complexes, compared to the Au–Cl bond in complexes (**1a**) and (**4**).

3.4. Cytotoxicity

HL-60 (acute myeloid leukemia), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) have been

Table 2
Selected bond lengths [Å] for [H₂2Ac4DH]Cl [32], [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**), H2Bz4Ph [33] and [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**).

Atoms	[H ₂ 2Ac4DH]Cl	(1a)	H2Bz4Ph	(4)
Au1–S1	–	2.2523(13)	–	2.2539(8)
Au1–Cl1	–	2.2700(13)	–	–
Au1–Cl2	–	–	–	2.2597(8)
S1–C8	1.681(3)	1.712(5)	1.663(2)	1.701(3)
N1–C6	1.335(3)	1.332(6)	1.335(3)	1.329(3)
N1–C2	1.352(3)	1.342(6)	1.343(2)	1.344(3)
N2–C7	1.293(3)	1.283(5)	1.296(2)	1.285(3)
N2–N3	1.358(3)	1.362(5)	1.362(2)	1.354(3)
N3–C8	1.371(3)	1.345(6)	1.360(2)	1.345(3)
N4–C8	1.308(4)	1.303(6)	1.343(3)	1.321(3)
N4–C9	–	–	1.410(2)	1.426(3)
C2–C7	1.480(3)	1.467(6)	1.484(3)	1.480(3)
C7–C9	1.488(4)	1.502(7)	–	–
C7–C15	–	–	1.492(3)	1.490(3)

Table 3

Selected bond angles [°] for [H₂2Ac4DH]Cl [32], [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**), H2Bz4Ph [33] and [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**).

Atoms	[H ₂ 2Ac4DH]Cl	(1a)	H2Bz4Ph	(4)
S1–Au1–Cl1	–	173.06(5)	–	–
S1–Au1–Cl2	–	–	–	173.27(3)
C8–S1–Au1	–	109.17(16)	–	107.70(10)
C6–N1–C2	122.7(3)	123.4(4)	118.3(2)	123.3(2)
C7–N2–N3	118.8(2)	119.6(4)	119.4(2)	118.3(2)
C8–N3–N2	119.8(2)	117.7(3)	120.5(2)	120.2(2)
N1–C2–C3	117.6(2)	117.5(4)	121.2(2)	118.0(2)
N1–C2–C7	117.8(2)	118.2(4)	118.1(2)	117.4(2)
C3–C2–C7	124.6(2)	124.3(4)	120.7(2)	124.6(2)
C2–C3–C4	120.4(3)	120.1(5)	119.0(2)	119.5(3)
C5–C4–C3	120.0(3)	119.4(5)	119.4(2)	120.3(3)
C6–C5–C4	118.5(3)	119.3(5)	118.6(2)	118.9(3)
N1–C6–C5	120.8(3)	120.2(5)	123.4(2)	120.0(3)
N2–C7–C2	114.4(2)	114.7(4)	127.5(2)	114.8(2)
N4–C8–N3	117.5(2)	119.6(4)	114.3(2)	118.3(2)
N4–C8–S1	124.7(2)	125.2(4)	128.0(1)	122.0(2)
N3–C8–S1	117.8(2)	115.1(3)	117.7(1)	119.8(2)

employed by the National Cancer Institute (NCI, US) in anticancer drug screen. Approximately one half of the chemotherapeutic drugs currently used by oncologists for cancer treatment were discovered and/or developed at NCI using this strategy. This screening model was rapidly recognized as a rich source of information about the mechanisms of growth inhibition and tumor-cell kill [35]. Jurkat is a cell line derived from human T-cell leukemia which is used to determine the mechanism of differential susceptibility to anti-cancer drugs and radiation.

Leukemia cells are used in screening programs of drug discovery as a predictive model to detect new potential anticancer chemical entities with target on the apoptosis pathway since in these cells apoptosis is very well characterized [36, 37].

Fig. 3 shows the percentages of cell proliferation *versus* control of Jurkat, HL-60, MCF-7 and HCT-116 cell lines in the presence of the thiosemicarbazones, their gold(I) complexes (**1–4**) and HAuCl₄. Since pyridine is a weak base, the proton from the pyridinium ion would be easily released in solution. Hence the active form of compounds (**2–4**) is most likely a neutral gold(I) complex. We used auranofin and cisplatin as positive controls.

According to Fig. 3, in general the thiosemicarbazones and their complexes (**1–4**) demonstrated cytotoxic effect against the tumor cell lines. Jurkat and HL-60 leukemia cells were more sensitive to the compounds than MCF-7 and HCT-116 cells.

The studied compounds were more cytotoxic than auranofin against Jurkat and HL-60 cells but were in general less active than auranofin against MCF-7 and HCT-116 cells. Many of the studied compounds showed cytotoxicity similar to cisplatin against the investigated leukemia cells. Among all studied compounds complex (**2**) was one of the most cytotoxic. Auranofin revealed to be less cytotoxic to the leukemia

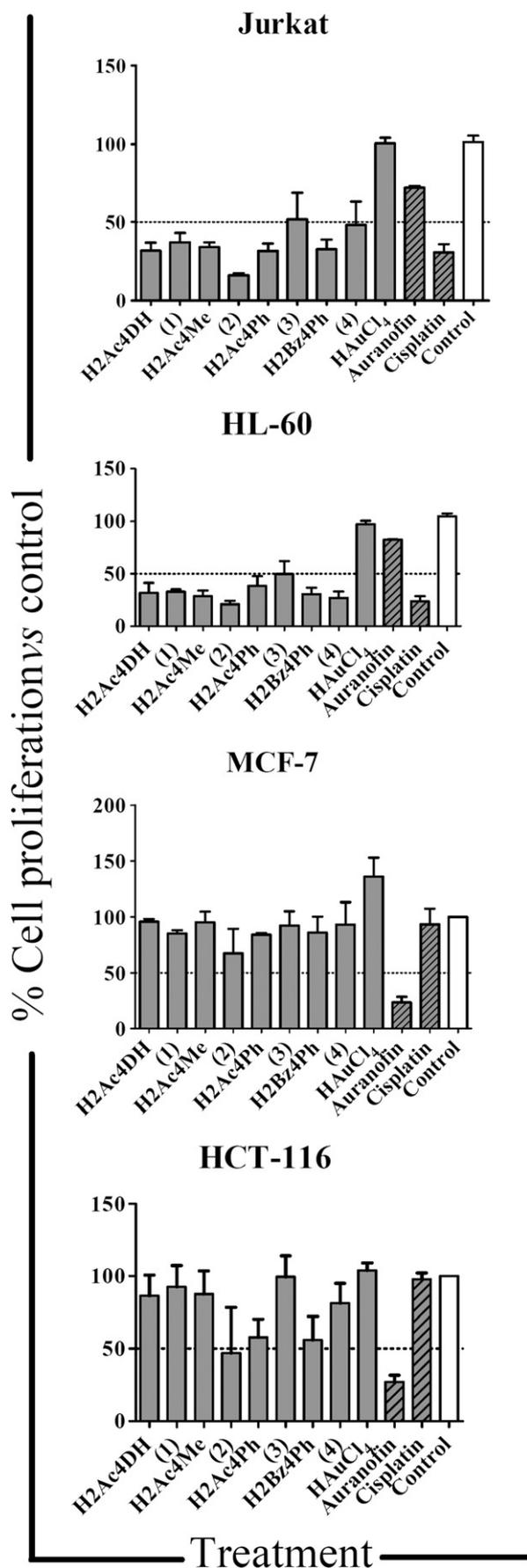
Table 4

Hydrogen bonds [Å and °] for [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**) and [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**).

Compound	D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
(1a)	N1–H1...Cl2A ⁱ	0.86	2.30	3.064(4)	148.7
	N3–H3...O1	0.86	2.03	2.842(5)	157.7
	N4–H4A...Cl2A ⁱ	0.86	2.49	3.277(4)	152.4
	N4–H4B...Cl2	0.86	2.47	3.247(4)	150.4
(4)	O1–H1B...Cl2B ⁱⁱ	0.809(19)	2.53(3)	3.284(5)	155(5)
	O1–H1A...Cl2C ⁱⁱⁱ	0.814(19)	2.51(3)	3.268(4)	157(5)
	N1–H1...Cl1	0.86	2.20	2.988(2)	151.9
	N4–H4A...Cl1	0.86	2.41	3.224(2)	157.1

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

i = –x + 2, –y + 1, –z + 1, ii = –x + 1, –y + 1, –z + 1, iii = x – 1, y, z.



cells than to the MCF-7 and HCT-116 solid tumor cells. The opposite behavior was observed for cisplatin in the assayed conditions. Interestingly, HAuCl₄ showed no cytotoxic effect against all cell lineages.

The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined for the thiosemicarbazones and complexes (1–4) against Jurkat and HL-60 cells and for complex (2) against MCF-7 and HCT-116 cells. In order to evaluate the toxicity of the compounds on normal cells, their IC₅₀ was also determined against peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (see Table 5). PBMC comprise cells including lymphocytes and monocytes, and are key cells in immune system homeostasis. The immune system can be a target for many chemicals including environmental contaminants and drugs with potential adverse effects on human health. Compounds may affect lymphocytes, which are the primary effectors and regulators of acquired immunity. If the cells are viable (80% or greater) basic functionality can be determined assessing cell proliferation by using mitogens such as phytohemagglutinin (PHA), a plant lectin [38]. In this context, PHA-stimulated PBMC proliferation needs the activation of several metabolic functions involved on immune response. Lymphocytes, in particular T cells, often act as master switches for extensive cascades of immunological processes involved on homeostasis, and on pathological processes [39]. Therefore we used this assay as indicative of the cytotoxicity of compounds as well as of their immunotoxic potential.

According to Table 5, the compounds were more cytotoxic against HL-60 than against Jurkat leukemia cells. H2Ac4Me and H2Ac4Ph were more cytotoxic than auranofin against both leukemia cell lineages. Activity improved on coordination in complexes (2) and (4) against HL-60 and Jurkat cells. Additionally, 2 proved to be more than fourfold more active against HL-60 cells than the H2Ac4Me ligand. 2 was the most active complex against both cell lines and was the only complex to be more cytotoxic than auranofin against the two leukemia cell lines. Complexes (2) and (4) were more cytotoxic against HL-60 cells than auranofin. 2 was as active as auranofin against MCF-7 cells but less active than auranofin against HCT-116 cells.

Auranofin was toxic to PBMC cells with a lower IC₅₀ than those determined for its anti-proliferative effect against the four tumor cell lines. Most of the studied compounds were less toxic against PBMC cells than auranofin, except H2Ac4Me and complex (2). Toxicity decreases upon coordination in complexes (3) and (4). H2Ac4DH and complex (4) exhibited lower activities against PBMC than against HL-60 cells, thus presenting a good therapeutic index.

In order to investigate the relationship between inhibition of cell proliferation induced by the studied compounds with apoptosis induction we decided to detect the sub-diploid DNA contents in the four tumor cell lines, which indicates DNA fragmentation by apoptosis. Different behaviors were observed (See Fig. 4).

At 10 μM all studied compounds were able to induce more than 50% of DNA fragmentation in HL-60 cells. Complex (2) was the compound that induced the least amount of DNA fragmentation, although it was the most cytotoxic. DNA fragmentation with apoptosis induction seems to be one mechanism of action of the studied compounds against HL-60 cells.

The compounds' ability to induce DNA fragmentation was in line with their activities against Jurkat cells, that is, in general the more active compounds the highest amount of DNA fragmentation, indicating that their mechanism of cytotoxic action might involve apoptosis induction.

The percentage of DNA fragmentation was determined only for complex (2) and auranofin in MCF-7 and HCT-116 cells. 2 and auranofin showed similar cytotoxic effects on MCF-7 cells and were

Fig. 3. Cytotoxic effect of thiosemicarbazones, their complexes (1–4), HAuCl₄, auranofin and cisplatin on Jurkat, HL-60, MCF-7 and HCT-116 cell lines. Cells were treated with compounds (10 μM) for 48 h and the cell proliferation/cell survival was measured by the MTT assay as described in methods. Data are expressed as mean ± SEM of percentage of cell proliferation compared to control (cells treated with DMF 0.1%). Representative data of at least three independent experiments performed in triplicate.

Table 5
Inhibition (IC_{50} , μM) of Jurkat, HL-60, MCF-7 and HCT-116 and PBMC cells proliferation by the thiosemicarbazones, their gold(I) complexes and auranofin. Representative data of at least three independent experiments performed in triplicate.

Compound	IC_{50} (μM) (Confidence interval 95%)				
	Jurkat ^a	HL-60 ^b	MCF-7 ^c	HCT-116 ^d	PBMC ^e
H2Ac4DH (1)	3.502 (0.7896 to 15.53)	2.078 (0.6162 to 7.008)			4.683 (3.115 to 7.042)
H2Ac4Me (2)	50.58 (27.53 to 92.93)	8.615 (6.604 to 11.24)			3.527 (2.618 to 4.751)
H2Ac4Ph (3)	1.422 (0.9881 to 2.047)	0.9251 (0.8120 to 1.054)			0.01250 (0.002454 to 0.06364)
H2Bz4Ph (4)	0.9319 (0.7563 to 1.148)	0.2022 (0.1114 to 0.3669)	1.65 (0.3278 to 8.303)	12.98 (7.236 to 23.27)	0.0002871 (0.00004219 to 0.001953)
Auranofin	1.675 (1.120 to 2.504)	0.07934 (0.03313 to 0.1900)			0.08250 (0.03369 to 0.2021)
	208.4 (56.19 to 773.2)	3.654 (2.036 to 6.560)			0.5222 (0.2494 to 1.093)
	22.99 (19.21 to 25.45)	3.623 (0.9090 to 14.44)			0.7047 (0.3626 to 1.370)
	6.855 (5.057 to 9.294)	1.162 (0.5439 to 2.481)			2.041 (0.4915 to 8.475)
	2.373 (1.323 to 4.258)	1.417 (0.6865 to 2.924)	1.505 (0.5727 to 3.953)	2.674 (1.959 to 3.650)	0.04726 (0.01322 to 0.1690)

^a Jurkat – immortalized line of T lymphocyte cells cell line.

^b HL-60 – acute myeloid leukemia cell line.

^c MCF-7 – human breast adenocarcinoma cell line.

^d HCT-116 – colorectal carcinoma cells.

^e PBMC – peripheral blood mononuclear cells.

both able to induce around 20% DNA fragmentation. Hence DNA fragmentation is probably not the main mechanism of action of these compounds. **2** promoted 100% DNA fragmentation in HCT-116 cells, whereas auranofin promoted around 35% DNA fragmentation. However, auranofin was significantly more active than complex (**2**). The results suggest that DNA fragmentation is probably the main mode of action of complex (**2**) but not of auranofin against HCT-116 cells.

3.5. Studies of interactions with supercoiled plasmid DNA

Since **2** was in general the most cytotoxic complex, its effect on DNA, a possible target for its cytotoxicity, was evaluated. The effect of complex (**2**) on DNA conformation was evaluated by the electrophoretic mobility of the plasmid pGEM-T after association with the complex. At the employed concentration (100 μM) the compound did not significantly alter the electrophoretic mobility of DNA. The

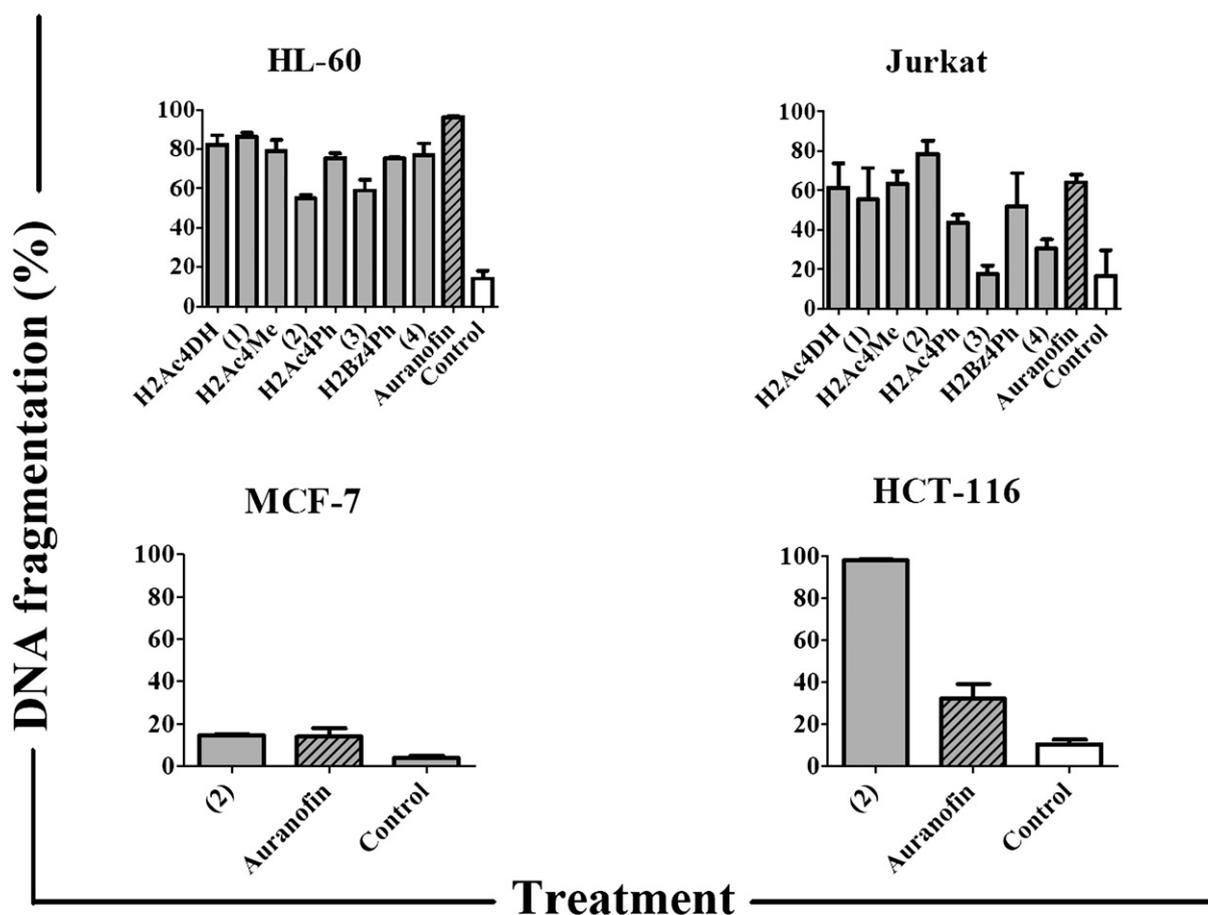


Fig. 4. Percentage of DNA fragmentation in Jurkat, HL-60, MCF-7 and HCT-116 cell lines induced by selected thiosemicarbazones, their gold(I) complexes and auranofin (10 μM). Data are expressed as mean \pm SEM of percentage of DNA fragmentation compared to control (cells treated with DMF 0.1%).

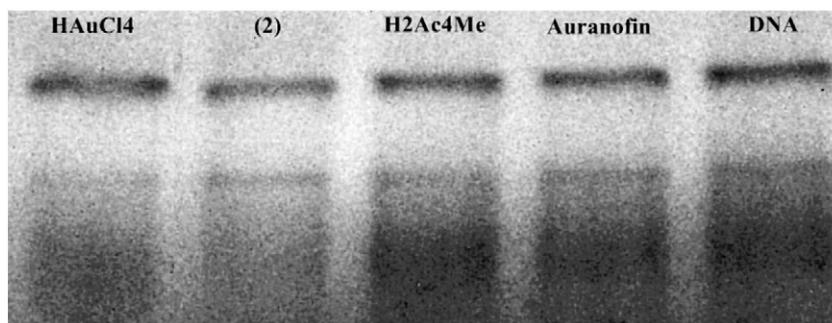


Fig. 5. Agarose (1%) gel electrophoresis pattern of pGEM®-T plasmid DNA incubated at 37 °C for 24 h without (control) or with compounds H2Ac4Me, **2** and HAuCl₄ at 100 μM.

free thiosemicarbazone H2Ac4Me and HAuCl₄ also did not modify the electrophoretic mobility of DNA (See Fig. 5). No plasmid DNA cleavage was observed in the presence of the studied compounds as evidenced by the electrophoretic pattern of DNA which did not undergo significant changes.

Hence, our investigation revealed either that these compounds at 100 μM do not directly interact with the DNA bases or that interaction, if it occurs, does not lead to stable adducts. In addition, the studied compounds did not induce DNA cleavage.

3.6. Inhibition of thioredoxin reductase (TrxR) activity

Inhibition of thioredoxin reductase (TrxR) was considered as another potential mechanism for the anti-proliferative activities of **1–4**. Thus, the *in vitro* inhibitory activities of **2**, H2Ac4Me, HAuCl₄ and auranofin were evaluated using isolated rat liver TrxR, by means of the DTNB reduction assay. This assay makes use of the fact that TrxR reduces the disulfide bonds of DTNB with formation of TNB, which can be detected photometrically.

Complex (**2**) inhibited the enzyme's activity with $EC_{50} = 2.476 \mu\text{M}$ (95% confidence interval = 2.076 to 2.953 μM) (See Fig. 6) suggesting TrxR as a possible biological target for the cytotoxic action of the complex. The ability of complex (**2**) to inhibit TrxR's activity was compared with those of H2Ac4Me, HAuCl₄ and auranofin at 0.5, 5.0 and 10 μM (Fig. 7), being the last one the same compound concentration used in the anti-proliferative effect assays. We observed that at 0.5 μM, H2Ac4Me and **2** did not inhibit the enzyme's activity, whereas HAuCl₄ and auranofin inhibited 38.2% and 78.9% of TrxR's activity, respectively. At 5.0 μM the percentages of inhibition of TrxR's activity were: 91.5% (**2**), 94.4% (HAuCl₄) and 90.6% (auranofin). At 10.0 μM, **2** inhibited 89.1% of TrxR's activity, while HAuCl₄ and auranofin inhibited 97.3% and 98.9% of TrxR's activity, respectively. H2Ac4Me was unable to inhibit the enzyme's activity in all assayed concentrations.

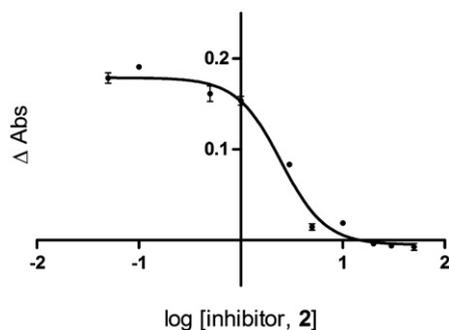


Fig. 6. Inhibitory effect of **2** on TrxR's activity: log[inhibitor, **2**] vs response (absorbance) curve obtained for IC_{50} determination. Enzyme (0.10 unit) was treated without (control) and with **2** (ten different concentrations in the 0.05–50.0 μM range) for 1 h and TrxR's activity was evaluated by the DTNB assay as described in methods. Representative data of experiments performed in triplicate.

Since not only the gold complex and auranofin but also HAuCl₄ strongly inhibited the enzyme's activity, the inhibitory effect of TrxR may be related to the presence of the gold ion. However, although HAuCl₄ is an inhibitor of TrxR's activity, it did not exhibit cytotoxic effect against HL-60, Jurkat, MCF-7 and HCT-116 tumor cell lines. The hydrophilic character of HAuCl₄ probably hinders its passage through the cell membrane. Unlike HAuCl₄, **2** not only inhibited TrxR's activity but also presented cytotoxic effect, which suggests that the thiosemicarbazone H2Ac4Me, in addition to its own cytotoxic activity, also probably acted as a carrier of the gold ion into the cells. Given the high cytotoxicity of the free ligand, it is possible that the cytotoxic effects of complex (**2**) could be mediated by both gold and the ligand itself following complex disruption as suggested by other authors [40,41]. In this case complex (**2**) would contain two entities to be directed to different targets in one same compound: the thiosemicarbazone, which targets RDR, and gold(I), which targets TrxR.

4. Conclusions

HAuCl₄ showed no cytotoxic effect against all cell lineages. Jurkat and HL-60 leukemia cells were more sensitive to the studied compounds than MCF-7 and HCT-116 cells. The compounds were more cytotoxic than auranofin against Jurkat and HL-60 cells and most of them were less toxic against PBMC cells than auranofin. In some cases activity against both HL-60 and Jurkat cells improved on coordination. **2** was the most cytotoxic complex against all cell lineages and was the only complex to be more cytotoxic than auranofin against the studied leukemia cell lines. **2** was the most active complex but proved to be more toxic to PBMC cells than auranofin. Since complex (**4**) revealed to be more active than its ligand H2Bz4Ph in both leukemia cell lineages, being threefold less toxic than H2Bz4Ph and fortyfold less toxic than auranofin it presents the best therapeutic index.

All studied compounds were able to induce more than 50% DNA fragmentation in HL-60 and Jurkat cells indicating apoptosis induction to be part of their mechanism of cytotoxic action.

2 and auranofin showed similar cytotoxic effects on MCF-7 cells and were both able to induce only around 20% DNA fragmentation, suggesting that DNA fragmentation is probably not the main mechanism of action of these compounds. Complex (**2**) promoted 100% DNA fragmentation in HCT-116 cells, whereas auranofin promoted around 35% DNA fragmentation. Since auranofin was significantly more active than complex (**2**) DNA fragmentation is probably an important mode of action of **2** but not of auranofin against HCT-116 cells.

Complex (**2**) inhibited thioredoxin reductase's (TrxR) activity suggesting TrxR as a possible biological target for its cytotoxic action. At 10.0 μM, **2**, auranofin and HAuCl₄ inhibited 90–99% of TrxR's activity, while H2Ac4Me was unable to inhibit the enzyme's activity in the assayed concentrations. Since not only complex (**2**) and auranofin but also HAuCl₄ strongly inhibited the enzyme's activity, the inhibitory effect of TrxR may be related to the presence of gold. However, although HAuCl₄ is an inhibitor of TrxR's activity, it did

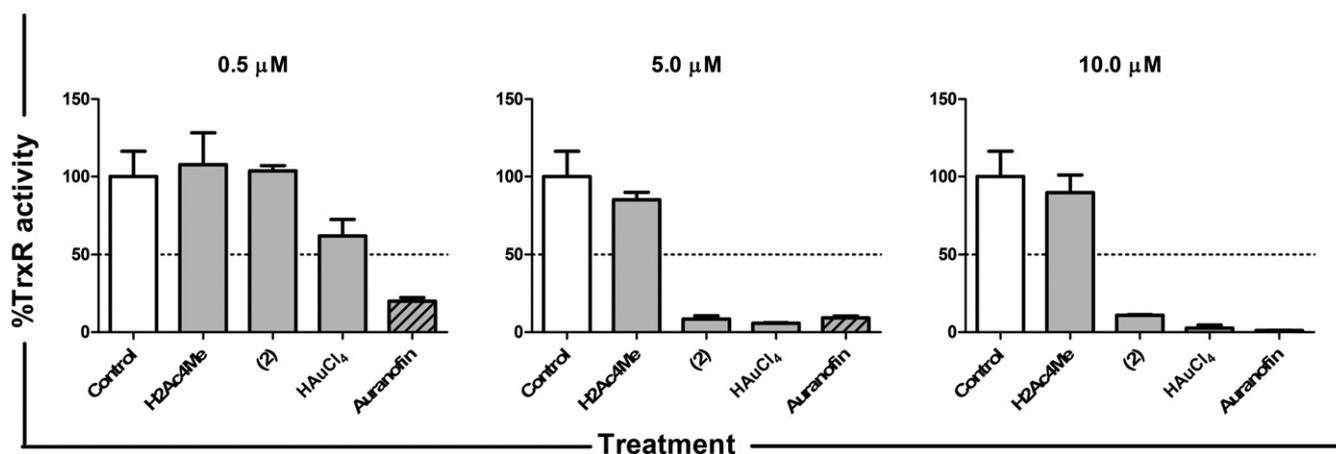


Fig. 7. Inhibitory effect of H2Ac4Me, **2**, HAuCl₄ and auranofin on TrxR. TrxR (0.10 unit) was incubated without (control) and with compounds at 0.5, 5.0 and 10.0 μM for 1 h at 37 °C. TrxR's activity was evaluated by the DTNB assay as described in methods. Representative data of experiments performed in triplicate.

not exhibit cytotoxic effect against the studied tumor cell lines, probably due to its hydrophilic character. Hence, the thiosemicarbazone, besides of its own cytotoxic effect, also probably acted as a carrier of gold ion into the cells.

The literature reports a number of works on gold complexes with TrxR inhibitory properties showing the relevance of this enzyme in the pharmacology of gold-based pharmaceuticals. Due to its antioxidant properties the thioredoxin system prevents cells from oxidative stress, which is a key factor for DNA damage. Overexpression of TrxR has been noticed in numerous tumor cell lines. Moreover, high levels of the substrate thioredoxin have been associated with resistance to cisplatin. Hence TrxR is considered as an attractive target for the development of novel anticancer agents [42]. It has been observed that apoptosis induction by auranofin in Jurkat T cells appeared to be mediated by inhibition of the cytosolic and mitochondrial forms of TrxR and that it was accompanied by an increase in cellular hydrogen peroxide levels [6].

The ability of complex (**2**) to act as an inhibitor of TrxR suggests that this mitochondrial protein is a potential cellular target, and that disruption of mitochondrial function could therefore be a potential mechanism of tumor cell death. Hence although complex (**2**) does not directly interact with DNA, and no plasmid DNA cleavage was observed in the presence of **2**, DNA fragmentation in HL-60, Jurkat and HCT-116 cells in the presence of this complex was probably due to its ability to inhibit TrxR. Inhibition of TrxR may trigger severe mitochondrial deregulation eventually leading to cell apoptosis. Since only 20% of DNA fragmentation was observed in MCF-7 cells in the presence of complex (**2**), TrxR is probably not the main target for the cytotoxic action of **2** in this case.

DNA fragmentation in the presence of auranofin could also be due to its ability to inhibit TrxR's activity.

Since the studied compounds showed a pro-apoptotic profile, they could also be considered as potential "anti-mitochondrial agents" like other gold complexes [42]. To our knowledge this is the first investigation on a gold complex with thiosemicarbazone which behaves as an inhibitor of TrxR.

Our results indicate that further studies of TrxR as a target for thiosemicarbazone's metal complexes should be carried on. The effects of the complexes on mitochondrial membrane potential and permeability, on the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria and on the expression of proteins associated with inhibition of mitochondrial function should be investigated.

Abbreviations

H2Ac4DH 2-acetylpyridine thiosemicarbazone
H2Ac4Me N(4)-methyl 2-acetylpyridine thiosemicarbazone

H2Ac4Ph N(4)-phenyl 2-acetylpyridine thiosemicarbazone
H2Bz4Ph N(4)-phenyl 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone
DMF dimethylformamide
DTNB dithiobisnitrobenzoic acid
NADPH nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PHA phytohemagglutinin
RPMI Roswell Park Memorial Institute
TrxR thioredoxin reductase
TNB 5-thionitrobenzol

Acknowledgments

This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6).

Appendix A. Supplementary data

CCDC ID: 827144 and 827145 contain the supplementary crystallographic data for [Au(H₂2Ac4DH)Cl]Cl·H₂O (**1a**) and [Au(H₂2Bz4Ph)Cl]Cl (**4**). 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. Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.09.008](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.008).

References

- Barreiro, J.S. Casas, M.D. Couce, A. Sánchez, A. Sánchez-González, J. Sordo, J.M. Varela, E.M.V. López, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 551–559.
- R. Rubbiani, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, A. Kitanovic, L.A. Onambele, M. Stefanopoulou, Y. Geldmacher, W.S. Sheldrick, G. Wolber, A. Prokop, S. Wölfl, I. Ott, J. Med. Chem. 53 (2010) 8608–8618.
- M.P. Rigobello, A. Folda, B. Dani, R. Menabò, G. Scutari, A. Bindoli, Eur. J. Pharmacol. 582 (2008) 26–34.
- F. Magherini, A. Modesti, L. Bini, M. Puglia, I. Landini, S. Nobili, E. Mini, M.A. Cinelli, C. Gabbiani, L. Messori, J. Biol. Inorg. Chem. 15 (2010) 573–582.
- E. Vergara, A. Casini, F. Sorrentino, O. Zava, E. Cerrada, M.P. Rigobello, A. Bindoli, M. Laguna, P.J. Dyson, ChemMedChem 5 (2010) 96–102.
- I. Ott, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1670–1681.
- H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem. 4 (2004) 31–39.
- R.A. Finch, M.C. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y.C. Cheng, A.C. Sartorelli, Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 983–991.
- 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.
- A.P. Rebollo, J.D. Ayala, G.M. Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 40 (2005) 467–472.
- I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870–1877.
- 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.
- K.S.O. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C.M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, Polyhedron 30 (2011) 315–321.

- [14] J.S. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, J. Ellena, A. Sánchez, J. Sordo, C. Taboada, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1858–1860.
- [15] U. Abram, K. Ortner, R. Gust, K. Sommer, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 735–744.
- [16] A.P. Rebolledo, G.M. Lima, N.L. Speziali, O.E. Piro, E.E. Castellano, J.D. Ardisson, H. Beraldo, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 3919–3930.
- [17] CRYCALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.33.55 (release 05-01-2010 CrysAlis171.NET).
- [18] CRYCALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.33.36 (release 16-03-2009 CrysAlis171.NET).
- [19] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112–122.
- [20] G. Gazzinelli, N. Katz, R.S. Rocha, D.G. Colley, *J. Immunol.* 130 (1983) 2891–2895.
- [21] T.J. Mosmann, *Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [22] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E. Wood, *J. Exp. Chem.* 50 (2004) 43–50.
- [23] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271–279.
- [24] I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D.H.W. Vlecken, I.J. Marques, D. Kubutat, J. Will, W.S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop, C.P.J. Bagowski, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 763–770.
- [25] I.G. Santos, A. Hagenbach, U. Abram, *Dalton Trans.* (2004) 677–682.
- [26] R.H.U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 267–275.
- [27] A. Castiñeiras, R. Pedrido, G. Pérez-Alonso, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2008) 5106–5111.
- [28] B. Chenon, C. Sandorfy, *Can. J. Chem.* 36 (1958) 1181–1206.
- [29] A. Garza-Ortiz, J. Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A.L. Spek, J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 1922–1930.
- [30] T.S. Lobana, S. Khanna, R.J. Butcher, *Inorg. Chem. Commun.* 11 (2008) 1433–1435.
- [31] S.D. Khanye, N.B. Báthori, G.S. Smith, K. Chibale, *Dalton Trans.* 39 (2010) 2697–2700.
- [32] S. Abram, U. Abram, Ulrich, *Acta Crystallogr. C* 53 (1997) 360–362.
- [33] A.P. 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] P.J. Bonasia, D.E. Cindelberger, J. Arnold, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 5126–5131.
- [35] R.H. Shoemaker, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 813–823.
- [36] K.A. Tacka, J.C. Dabrowiak, J. Goodisman, H.S. Penefsky, A.K. Souid, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1102–1111.
- [37] M. Monga, E.A. Sausville, *Leukemia* 16 (2002) 520–526.
- [38] M. Carfi, A. Gennari, I. Malerba, E. Corsini, M. Pallardy, R. Pieters, H. Van Loveren, H.W. Vohr, T. Hartung, L. Gribaldo, *Toxicology* 229 (2007) 11–22.
- [39] F.F. Mahmoud, D.D. Haines, H.T. Abul, A.T. Abal, B.O. Onadeko, J.A. Wise, *J. Pharmacol. Sci.* 94 (2004) 129–136.
- [40] A.N. Wein, A.T. Stockhausen, K.I. Hardcastle, M.R. Saadein, S. Peng, D. Wang, D.M. Shin, Z. Chen, J.F. Eichler, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 663–668.
- [41] L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3541–3548.
- [42] A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1692–1707.