

Perfil farmacológico de  
compostos com aplicações como  
agentes antineoplásicos,  
antimicrobianos e contra doenças  
neurodegenerativas

**Karina Silva de Oliveira Ferraz**

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

Karina Silva de Oliveira Ferraz

Perfil farmacológico de compostos com  
aplicações como agentes antineoplásicos,  
antimicrobianos e contra doenças  
neurodegenerativas

Belo Horizonte

2012

UFMG-ICEX/DQ-915<sup>a</sup>

T. 402

Karina Silva de Oliveira Ferraz

Perfil farmacológico de compostos com aplicações  
como agentes antineoplásicos, antimicrobianos e  
contra doenças neurodegenerativas

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

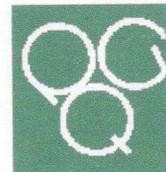
F381p Ferraz, Karina Silva de Oliveira  
2012 Perfil farmacológico de compostos com aplicações  
T como agentes antineoplásicos, antimicrobianos e contra  
doenças neurodegenerativas / Karina Silva de Oliveira  
Ferraz. 2012.  
167 f. : il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Complexos  
metálicos - Teses 3. Agentes antineoplásicos - Teses  
4. Atividade antifúngica - Teses I. Beraldo, Heloisa  
de Oliveira, Orientadora II. Título.

CDU 043



**"Perfil Farmacológico de Compostos com Aplicações como Agentes Antineoplásicos, Antimicrobianos e Contra Doenças Neurodegenerativas"**

**Karina Silva de Oliveira Ferraz**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Victor Marcelo Deflon  
USP-SÃO CARLOS

  
Profa. Flávia Cavaliéri Machado  
UFJF

  
Profa. Ynara Marina Idemori  
UFMG

  
Prof. Bernardo Lage Rodrigues  
UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2012.

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

## **DEDICATÓRIA**

Esse trabalho é dedicado ao meu amado esposo Jarbas, grande responsável pelo início e continuação do curso. Certamente o mérito dessa conquista também é seu.

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Senhor da minha vida, Jesus Cristo, porque ele é digno de toda honra e gratidão do meu coração. Sem ele eu não conseguiria!
- ✓ À Profa. Heloisa pela orientação, ensinamentos e paciência durante esse tempo.
- ✓ Ao meu amor Jarbas. Você é o meu suporte em todo tempo. Sempre me incentiva a prosseguir. Não tenho palavras pra te agradecer por todo amor, esforço e paciência que me ajudaram a chegar até aqui.
- ✓ Aos meus queridos pais, que sempre me apoiaram com muito amor e compreensão. Como é difícil ficar longe de vocês! Obrigada por me abençoar tanto! Amo vocês!
- ✓ Ao meu irmão Leonardo pelo carinho e apoio e à minha irmã e melhor amiga Aline que sempre me incentiva e me alegra juntamente com meu cunhado Fagner e meu sobrinho Daniel. Amo vocês!
- ✓ Aos cunhados Fabinho e Margarete pelas palavras de incentivo e carinho e ao meu sobrinho Miguel.
- ✓ Aos meus familiares que sempre me ajudaram e incentivaram. Obrigada por tudo!
- ✓ Aos meus amigos de perto e de longe que sempre me ajudaram a prosseguir. Deus colocou pessoas muito especiais na minha vida!
- ✓ Aos queridos irmãos da Igreja Batista em Aarão Reis- BH e também aos irmãos da Primeira Igreja Batista em Jardim Camburi-Vitória pelas orações e apoio. Muito obrigada!
- ✓ Aos colegas de laboratório Débora, Gabrieli, Josane, Luiza, Jeferson, Angel e Rafael pela amizade, ajuda, carinho e muitas risadas demonstrados no dia-a-dia e também aos alunos de iniciação Ana Carolina, Sarah, Mariany e Pedro.
- ✓ Aos pesquisadores Dra. Isolda Maria de Castro Mendes, Dra. Elaine Maria Souza-Fagundes, Dra Raquel Gouveia dos Santos, Dr. Nivaldo Speziali, Dr. Bernardo Lages Rodrigues, Dr. Jarbas Magalhães Resende, Dr. José Domingos Ardisson, Dr. Daniel de Assis Santos, Dra. Magna Suzana, Dr. Willian Rocha, Dra. Maria Aparecida Gomes e Dra. Renata Celi Carvalho de Souza Pietra pela colaboração na realização deste trabalho.
- ✓ Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, Paulete, Lilian e Kátia pela atenção e carinho.
- ✓ Aos professores e colegas do Departamento de Química pela amizade e ajuda durante esse tempo.
- ✓ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Se você parar de aprender,  
logo esquecerá o que sabe.”

Provérbios 19:27

## RESUMO

O presente trabalho consistiu na síntese e estudo do perfil farmacológico de três classes de compostos – tiossemicarbazonas, *bis*(fenilhidrazonas) e clioquinol – e seus complexos metálicos. A potencial capacidade de tiossemicarbazonas selecionadas de atuarem como agentes quelantes para uso na remoção de metais de cérebros de pacientes portadores de doenças neurodegenerativas foi investigada. Os efeitos citotóxicos de tiossemicarbazonas, *bis*(fenilhidrazonas), clioquinol e seus complexos metálicos foram avaliados frente a células de leucemia e de tumores sólidos, e foi estudada a ação antimicrobiana dos compostos em culturas de bactérias e fungos.

Uma série de tiossemicarbazonas com caráter bidentado foi planejada, as quais em princípio poderiam atuar pela complexação e remoção de metais associados a doenças neurodegenerativas. Doze tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona *N*(3)-substituídas foram obtidas, sendo oito delas inéditas. Quatro estruturas cristalográficas foram determinadas. A atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, e a atividade citotóxica desses compostos frente a células leucêmicas (HL-60, Jurkat e K562), de tumor mamário (MCF-7) e de glioblastomas (U-87 e T-98) humanos foram avaliadas, porém, todos os compostos revelaram-se pouco ativos. Acetofenona-*N*(3)-*meta*-toluil tiossemicarbazona mostrou baixa toxicidade oral *in vivo*. A capacidade quelante, a baixa toxidez frente a diferentes sistemas biológicos e o valor de logP na faixa adequada para chegar ao cérebro sugerem que esse composto em particular e a família de tiossemicarbazonas estudadas poderiam constituir novos candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento de pacientes com doenças neurodegenerativas.

Foram obtidos oito complexos de zinco(II) com as tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona *N*(3)-*meta*- substituídas. Duas estruturas cristalográficas foram determinadas. Todos os complexos foram inativos contra o crescimento de bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Complexos de ouro(I, III) e de platina(II, IV) foram preparados com 2-formilpiridina-, 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina- *N*(4)-toluil- tiossemicarbazonas. Os efeitos citotóxicos dos compostos foram investigados frente a células de glioblastomas humanos U-87 e T-98 e células sadias de fibroblastos de pulmão de feto humano (MRC-5). As tiossemicarbazonas livres mostraram-se altamente citotóxicas frente a todas as linhagens celulares. Em alguns casos, a coordenação aos metais melhorou o efeito citotóxico. Alguns compostos revelaram-se mais ativos que cisplatina e auranofina. Os complexos de ouro(I, III) foram mais ativos que seus análogos de platina(II, IV) contra as células U-87 e T-98. Por sua vez, a maioria dos complexos de platina(IV) foi mais ativa que seus análogos de platina(II) contra as duas linhagens de células.

2-Acetilpiridina-*N*(4)-*meta*-toluil tiossemicarbazona, seus complexos de ouro(III) e de platina(II, IV) foram avaliados quanto à capacidade em inibir a atividade da enzima tioredoxina redutase (TrxR). Apenas o complexo de ouro(III) inibiu significativamente a atividade da TrxR. Os

mesmos compostos foram avaliados quanto à interação com ADN plasmidial. Apenas os complexos de platina(II, IV) interagiram significativamente com o ADN. Esses resultados sugerem que os modos de ação citotóxica dos complexos de platina podem ter como alvo principal o ADN, enquanto que os complexos de ouro agem majoritariamente pela inibição da enzima TrxR.

Complexos de bismuto(III) e antimônio(III) foram preparados com 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazona) e seus derivados. Duas estruturas cristalográficas foram determinadas. As atividades antimicrobianas dos compostos foram avaliadas contra o crescimento de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. As *bis*(fenilhidrazonas) não foram ativas contra o crescimento dos microorganismos. Em geral, a coordenação a bismuto(III) e antimônio(III) fez aumentar a atividade antifúngica. Os complexos de bismuto(III) foram mais potentes como antimicrobianos do que seus análogos de antimônio(III).

A citotoxicidade das *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) foi avaliada frente as células HL-60, MCF-7, HCT-116 (carcinoma colo retal) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Em geral, as *bis*(fenilhidrazonas) foram pouco ativas. A coordenação ao bismuto(III) foi uma boa estratégia para aumentar o efeito citotóxico das *bis*(fenilhidrazonas) contra todas as linhagens de células. Os complexos de bismuto(III) foram mais ativos que seus análogos de antimônio(III) e, na maioria dos casos, mais ativos que a cisplatina. Em geral, os complexos de bismuto(III) exibiram bons valores de índices terapêuticos. Para as *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III), a morte por apoptose não é o único modo de ação citotóxica.

A atividade das *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de antimônio(III) foi avaliada contra *Leishmania (L.) amazonensis*. Os compostos apresentaram atividade contra *L. amazonensis*. A coordenação ao antimônio (III) não fez melhorar a atividade.

Foram preparados complexos de clioquinol com platina(II, IV). A estrutura cristalográfica do complexo de platina(II) foi determinada. A atividade citotóxica foi avaliada frente a células Jurkat, HL60, MCF-7 e HCT-116 e todos os compostos revelaram-se pouco ativos contra todas as células. Os complexos foram aproximadamente quatro vezes mais ativos que o clioquinol e pouco mais ativos que a cisplatina contra as células HL-60.

Dois complexos de estanho(IV) foram obtidos com o clioquinol. A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. A coordenação do clioquinol ao estanho(IV) fez aumentar a atividade antifúngica, mas não melhorou a atividade antibacteriana. Os complexos foram aproximadamente cem vezes mais ativos como antifúngicos do que o fluconazol. A ação antifúngica do clioquinol e dos complexos de estanho(IV) foi avaliada contra quatro espécies de *Candida spp.* (*C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*). Em geral, a coordenação a estanho(IV) melhorou a atividade do clioquinol contra a maioria das espécies.

O efeito da combinação dos complexos de estanho(IV) com o fluconazol foi avaliado frente a doze cepas de *C. albicans*. Em muitos casos, a atividade das combinações dos complexos com o fluconazol foi melhor do que a combinação clioquinol/fluconazol.

O presente trabalho constitui importante contribuição à Química Medicinal Inorgânica uma vez que novos candidatos a protótipos de fármacos foram estudados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, de tumores e de infecções microbianas.

Palavras-chave: tiossemicarbazonas, *bis*(fenilhidrazonas), clioquinol, complexos metálicos, atividade farmacológica

## ABSTRACT

The present work involved the syntheses and a study on the pharmacological profile of three classes of compounds: thiosemicarbazones, *bis*(benzoylhydrazones) and clioquinol, as well as their metal complexes. The potential ability of selected thiosemicarbazones to function as chelating agents for the treatment of neurodegenerative disorders was investigated. The cytotoxic effects of thiosemicarbazones, *bis*(benzoylhydrazones), clioquinol and some of their metal complexes was studied against leukemia and solid human tumor cell lineages. The antimicrobial effects of the *bis*(benzoylhydrazones), clioquinol and their metal complexes was also investigated.

A series of bidentate thiosemicarbazones was designed which could in principle act by complexing and removing metal ions associated to neurodegenerative diseases. Twelve *N*(3)-*meta*-substituted acetophenone- and benzophenone-derived thiosemicarbazones were obtained. Eight among these thiosemicarbazones were synthesized for the first time in the present work. Four crystal structures were determined. All thiosemicarbazones proved to be inactive against the growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, and showed very low cytotoxic activities against HL-60, Jurkat and K562 leukemia cells and against MCF-7 (breast cancer) and U-87 and T-98 glioma cell lineages. Acetophenone-*N*(3)-*meta*-tolyl thiosemicarbazone showed low oral acute toxicity *in vivo*. The chelating ability of this compound, its low oral toxicity and low pharmacological effects, together with its logP which favors its passage through the cell membranes suggest that the compound could be interesting as a new drug candidate prototype to treat neurodegenerative disorders.

Eight zinc(II) complexes were obtained with the acetophenone- and bezophenone-derived thiosemicarbazones. Two crystal structures were determined. All complexes proved to be inactive against the growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria.

Gold (I, III) and platinum(II, IV) complexes were obtained with 2-formylpyridine, 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine- *N*(4)-tolyl thiosemicarbazone. The cytotoxicities of the compounds were investigated against U-87 and T-98 human glioma cells and against MRC-5 human fetus lung fibroblast cells. The thiosemicarbazones proved to be cytotoxic to all cells. Upon coordination the cytotoxic effect increased in some cases. Some of the studied compounds showed higher cytotoxic activity than cisplatin and auranofin. The gold(I, III) complexes revealed to be more active than the corresponding platinum(II, IV) complexes against U-87 and T-98 cells. The platinum(IV) complexes were more cytotoxic than the corresponding platinum(II) counterparts against U-87 and T-98 glioma cell lineages.

2-Acetylpyridine-*N*(4)-*meta*-tolyl thiosemicarbazone and its gold(III) and platinum(II, IV) complexes were evaluated for their ability to inhibit the activity of thioredoxin reductase (TrxR)

enzyme. Only the gold(III) complex significantly inhibit TrxR's activity. The same compounds were evaluated for their ability to interact with plasmid DNA. Only the platinum(II, IV) complexes strongly interacted with DNA. The foregoing results suggest that the mode of cytotoxic action of the platinum compounds involves DNA as a target while the cytotoxic effect of the gold compounds involves inhibition of TrxR.

Bismuth(III) and antimony(III) complexes were obtained with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazone) and its derivatives. Two crystal structures were determined. The antimicrobial activities of the compounds were evaluated against the growth of *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The *bis*(benzoylhydrazones) were inactive against all tested microorganisms. Upon coordination to both bismuth(III) and antimony(III) the antifungal activity increased. The bismuth(III) complexes revealed to be more active as antimicrobials than their antimony(III) counterparts.

The *bis*(benzoylhydrazones) and their bismuth(III) and antimony(III) complexes were assayed as well for their cytotoxic activities against Jurkat and HL-60 leukemia, MCF-7 and HCT-116 (colo-rectal carcinoma) tumor cell lineages and against peripheral blood mononuclear (PBMC) cells. In general the *bis*(benzoylhydrazones) showed low cytotoxic activity against all cell lines. Coordination to bismuth(III) proved to be an efficient strategy for activity improvement against all cell lineages. The bismuth(III) complexes were more cytotoxic than the antimony(III) analogs and most of them were more active than cisplatin. In general, the bismuth(III) complexes exhibited good therapeutic indexes. For the *bis*(benzoylhydrazones) and their bismuth(III) complexes apoptosis induction is not the only mode of cytotoxic activity.

The *bis*(benzoylhydrazones) and their antimony(III) complexes were tested for their activity against *Leishmania (L.) amazonensis*. The activity of 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazones) was demonstrated for the first time in the present work. Coordination did not affect the anti-leishmanial activity of the *bis*(hydrazones).

Complexes of clioquinol were obtained with platinum(II, IV). The crystal structure of the platinum(II) complex was determined. The cytotoxicity was evaluated against Jurkat, HL60, MCF-7 and HCT-116 cells. Both complexes were fourfold more active than clioquinol and slightly more active than cisplatin against HL-60 cells.

Two organotin(IV) complexes were obtained with clioquinol. The antimicrobial activities of clioquinol and its tin(IV) complexes was assayed against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. Coordination to tin(IV) proved to be a good strategy for improving the antifungal but not the antibacterial activity of clioquinol. The complexes revealed to be 100-fold more active as antifungal agents than fluconazole. The antifungal activity of clioquinol and its organotin complexes was evaluated against four species of *Candida spp.* (*C. albicans*, *Candida krusei*,

*Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*). In general coordination to tin(IV) resulted in higher antifungal activity against most of the *Candida* species.

Combinations of the organotin complexes with fluconazole were assayed against twelve isolates of *C. albicans*. In many cases the organotin complexes/fluconazole combinations were more potent as antifungals than the clioquinol/fluconazole combination.

The present work is an important contribution to Medicinal Inorganic Chemistry since new drug candidate prototypes were investigated for the treatment of neurodegenerative disorders, neoplasias and microbial infections.

Keywords: *thiosemicarbazones, bis(benzoylhydrazones), clioquinol, metal complexes, pharmacological activity*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1-</b> Estrutura da cisplatina e seus análogos carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina....	2
<b>Figura 1.2-</b> Estrutura genérica das tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -piridínicas.....	6
<b>Figura 1.3-</b> Estrutura geral de <i>bis</i> (hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina.....	9
<b>Figura 1.4-</b> Estrutura de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol).....	10
<b>Figura 2.1-</b> Esquema de síntese de HAc3oT, HAc3mT, HAc3pT, HBz3oT, HBz3mT, HBz3pT, HAc3mCl, HAc3mF, HBz3mNO <sub>2</sub> , HBz3mCl, HBz3mF e HBz3mNO <sub>2</sub> .....	15
<b>Figura 2.2</b> - Esquema de síntese dos complexos de zinco(II) de <i>N</i> (3)- <i>m</i> -clorofenil, <i>N</i> (3)- <i>m</i> -flúorfenil, <i>N</i> (3)- <i>m</i> -nitrofenil e <i>N</i> (3)- <i>m</i> -toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetofenona e 2-benzofenona.....	16
<b>Figura 2.3-</b> Esquema de síntese do complexo de ouro(I) de 2-formilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>p</i> - toluil tiossemicarbazona e dos complexos de ouro(III) de 2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>o</i> -, <i>N</i> (4)- <i>m</i> - e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil tiossemicarbazonas e 2-benzoilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>p</i> - toluil tiossemicarbazona.....	16
<b>Figura 2.4</b> - Esquema de síntese dos complexos de platina(II) de 2-acetilpiridina <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>m</i> -toluil e <i>p</i> -toluil tiossemicarbazonas.....	17
<b>Figura 2.5-</b> Esquema de síntese dos complexos de platina(IV) de 2-acetilpiridina <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil tiossemicarbazonas.....	17
<b>Figura 2.6-</b> Esquema de síntese dos complexos de antimônio(III) e bismuto(III) de <i>bis</i> (fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina.....	18
<b>Figura 2.7-</b> Esquema de síntese dos complexos organoestânicos e de platina(II, IV) de clioquinol.....	19
<b>Figura 2.8</b> - Fluxograma do experimento de avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> .....	27
<b>Figura 3.1-</b> Estrutura geral das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona (R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ) e de benzofenona (R <sub>1</sub> = Ph).....	30
<b>Figura 3.2</b> - Espectro no infravermelho de HAc3mCl ( <b>5</b> ) obtido em pastilha de KBr na região entre 4000-400 cm <sup>-1</sup> .....	32
<b>Figura 3.3-</b> Espectro no infravermelho de HBz3mCl ( <b>10</b> ) obtido na região de 4000-400 cm <sup>-1</sup> , em pastilha de KBr.....	32
<b>Figura 3.4-</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para HAc3mF ( <b>6</b> ) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz.....	33
<b>Figura 3.5-</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para HBz3mF ( <b>11</b> ) DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz.....	34

<b>Figura 3.6-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para HAc3mF (6) em DMSO- $d_6$ , 200 MHz.....	36
<b>Figura 3.7-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para HBz3mF (11) em DMSO- $d_6$ , 200 MHz.....	36
<b>Figura 3.8-</b> Diagrama molecular das tiossemicarbazonas (a) HAc3oT (1), (b) HAc3mT (2) e (c) HBz3oT (8) .....	38
<b>Figura 3.9</b> Estrutura de HAc3mF (6) e seu dímero formado por duas ligações de hidrogênio.....	39
<b>Figura 3.10-</b> Massa corporal dos animais durante o experimento com a dose de 300 mg $\text{kg}^{-1}$ (A) e de 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ (B) (n=6).....	44
<b>Figura 3.11</b> - Consumo de ração dos animais, em gramas, durante o experimento com a dose de 300 mg $\text{kg}^{-1}$ (A) e de 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ (B) (n=6).....	45
<b>Figura 3.12</b> - Consumo de água (em gramas) durante o experimento com a dose de 300 mg $\text{kg}^{-1}$ (A) e de 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ (B) (n=6). *Significativamente diferente do grupo controle pelo teste de F (p<0,05).....	45
<b>Figura 3.13</b> - Peso dos órgãos coração, pulmão, estômago e cérebro no tratamento com a dose de 300 mg $\text{kg}^{-1}$ (A) e de 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ (B).....	46
<b>Figura 3.14</b> - Peso dos órgãos fígado, baço, rins e útero no tratamento com a dose de 300 mg $\text{kg}^{-1}$ (A) e de 2000 mg $\text{kg}^{-1}$ (B).....	46
<b>Figura 4.1-</b> Estrutura geral para os complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona.....	49
<b>Figura 4.2</b> - Espectros eletrônicos de HAc3mCl e seu complexo $[\text{Zn}(\text{Ac}3\text{mCl})_2]$ (3).....	50
<b>Figura 4.3-</b> Espectro no infravermelho de HBz3mT e seu complexo $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mT})_2]$ (2) na região de 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ , em pastilha de KBr.....	52
<b>Figura 4.4-</b> Espectro no infravermelho de HBz3mT e seu complexo $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mT})_2]$ (2) região de 500-200 $\text{cm}^{-1}$ , suporte CsI/nujol.....	52
<b>Figura 4.5-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ entre 11-6,5 ppm de HAc3mF e seu complexo $[\text{Zn}(\text{Ac}3\text{mF})_2]$ (5) em DMSO- $d_6$ , 200 MHz.....	54
<b>Figura 4.6-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ entre 11-6 ppm de HBz3mF e seu complexo $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mF})_2]$ (6) em DMSO- $d_6$ , 200 MHz.....	54
<b>Figura 4.7-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HBz3mF e seu complexo $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mF})_2]$ (6) em DMSO- $d_6$ , 200 MHz.....	57
<b>Figura 4.8</b> - Diagrama molecular de $[\text{Zn}(\text{Ac}3\text{mCl})_2]$ (3) e de $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mF})_2]\cdot\text{DMSO}$ (6a).....	60

<b>Figura 5.1-</b> Isômeros configuracionais <i>Z</i> e <i>E</i> de tiossemicarbazonas derivadas de piridina.....	65
<b>Figura 5.2 -</b> Curva termogravimétrica para o complexo $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> ).....	67
<b>Figura 5.3-</b> Espectros de massas do complexo $[\text{Au}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$ ( <b>2</b> ) em metanol.....	68
<b>Figura 5.4-</b> Estruturas propostas para os complexos de ouro (I, III) com <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.....	68
<b>Figura 5.5-</b> Espectros no infravermelho de $\text{H}_2\text{Ac}4m\text{T}$ e seu complexo $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> ) obtidos em pastilha de KBr, $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .....	70
<b>Figura 5.6-</b> Espectros no infravermelho $\text{H}_2\text{Ac}4m\text{T}$ e seu complexo $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> ) obtidos na região de $500\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ , suposte CsI/nujol.....	70
<b>Figura 5.7-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ entre 10-2 ppm de $\text{H}_2\text{Ac}4p\text{T}$ e seu complexo de ouro(III) $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ ( <b>4</b> ) em $\text{MeOD-}d_4$ , 200 MHz.....	73
<b>Figura 5.8-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ entre 14-7 ppm de $\text{H}_2\text{Bz}4p\text{T}$ e seu complexo de ouro(III) $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{ABz}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{HCl}$ ( <b>5</b> ) em $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.....	74
<b>Figura 5.9-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ entre 16-6,5 ppm dos complexos $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Fo}4p\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>1</b> ) e $[\text{Au}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$ ( <b>2</b> ) em $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz.....	75
<b>Figura 5.10-</b> Espectro de infravermelho de $\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T}$ e seus complexos $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2]$ ( <b>6</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$ ( <b>9</b> ) obtido em pastilha de KBr, $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .....	79
<b>Figura 5.11-</b> Estruturas propostas para os complexos de platina(II) $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2]$ ( <b>6</b> ), $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$ ( <b>7</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>8</b> ) e para os complexos de platina(IV) $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$ ( <b>9</b> ), $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$ ( <b>10</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$ ( <b>11</b> ).....	80
<b>Figura 5.12-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de $\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T}$ e seus complexos $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2]$ ( <b>6</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$ ( <b>9</b> ) em $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.....	82
<b>Figura 5.13-</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$ ( <b>9</b> ) sem e com adição de $\text{D}_2\text{O}$ em $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.....	83
<b>Figura 5.14-</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ na região entre 180-115 ppm de $\text{H}_2\text{Ac}4p\text{T}$ e seu complexo $[\text{Pt}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>8</b> ) em $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.....	85
<b>Figura 5.15-</b> Diagrama molecular dos complexos $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>6a</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>7a</b> ). Em <b>6a</b> os átomos de hidrogênios foram omitidos para uma melhor visualização da desordem no grupo toluil.....	87
<b>Figura 5.16-</b> Diagramas de empacotamento molecular dos complexos $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>6a</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>7a</b> ).....	91
<b>Figura 5.17-</b> Efeito de $\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T}$ , $\text{H}_2\text{Ac}4m\text{T}$ e $\text{H}_2\text{Ac}4p\text{T}$ e seus complexos de platina(II) $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2]$ ( <b>6</b> ), $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$ ( <b>7</b> ) e $[\text{Pt}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}]$ ( <b>8</b> ) e de platina(IV)	

[Pt(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>9</b> ), [Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>10</b> ) e [Pt(2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>11</b> ) sobre a proliferação de células MCF-7, HL-60 e Jurkat.....	92
<b>Figura 5.18</b> - Alterações morfológicas induzidas por tratamento com tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro (1μ): fotomicrografias de células de glioblastoma (T-98 e U-87) e células MRC-5.....	95
<b>Figura 5.19</b> - Efeito inibitório de H <sub>2</sub> Ac4mT, [Au(H <sub>py</sub> 2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) (cAM), [Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl] (cPt(II)), [Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH] (cPt(IV)), HAuCl <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> , auranofina e cisplatina na TrxR. A TrxR (0,10 unid) foi incubada com os compostos a 10 μM por 1 h a 37 °C.....	97
<b>Figura 5.20</b> - Eletroforese em gel de agarose gel do ADN plasmidial pUC 19 tratado com os compostos H <sub>2</sub> Ac4mT, [Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl] (cPt(II)), [Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH] (cPt(IV)), K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> , cisplatina (Cisp), [Au(H <sub>py</sub> 2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·H <sub>2</sub> O (cAu(III)), HAuCl <sub>4</sub> e auranofina (Aur) a 200 μM em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.2) incubado a 37 °C por 24 h.....	98
<b>Figura 6.1</b> - Estrutura geral de 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (fenilhidrazona) e seus derivados <i>bis</i> ( <i>para</i> -clorofenil) (H <sub>2</sub> AcpClPh) e <i>bis</i> ( <i>para</i> -nitrofenil) (H <sub>2</sub> AcpNO <sub>2</sub> Ph).....	100
<b>Figura 6.2</b> - Espectro no infravermelho do ligante H <sub>2</sub> AcPh e seu complexo [Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> ) obtido em pastilha de KBr na região de 4000-400 cm <sup>-1</sup> .....	103
<b>Figura 6.3</b> - Espectro no infravermelho de H <sub>2</sub> AcPh e seu complexo [Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> ) na região de 500-200 cm <sup>-1</sup> , suporte CsI/nujol.....	103
<b>Figura 6.4</b> - Espectro eletrônico de H <sub>2</sub> AcpClPh e seus complexos [Bi(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> ) e [Sb(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>4</b> ) (DMF).....	104
<b>Figura 6.5</b> - Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de H <sub>2</sub> AcPh e do seu complexo complexo [Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> ) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz.....	107
<b>Figura 6.6</b> - Diagrama molecular dos complexos [Sb(AcpClPh)Cl] ( <b>4a</b> ) e [Bi(AcpNO <sub>2</sub> Ph)(DMSO)Cl] ( <b>5a</b> ).....	108
<b>Figura 6.7</b> - Conteúdo ADN subdiplóide induzido pelas <i>bis</i> (fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) em células de HL60, Jurkat, MCF-7 e HCT-116.....	116
<b>Figura 7.1</b> - Estrutura de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol, HQI).....	117
<b>Figura 7.2</b> - Espectro no infravermelho do clioquinol e seu complexo [Pt(QI) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·KCl ( <b>2</b> ) obtido em pastilha de KBr, 4000-400 cm <sup>-1</sup> .....	119
<b>Figura 7.3</b> - Espectro no infravermelho do clioquinol e seu complexo [Pt(QI) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·KCl( <b>2</b> ) obtido em nujol/CsI, 650-200 cm <sup>-1</sup> .....	120
<b>Figura 7.4</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do clioquinol e seu complexo de platina(II)	

[Pt(QI) <sub>2</sub> ].2KCl ( <b>1</b> ) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz.....	121
<b>Figura 7.5</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H entre 9,5-7,0 ppm do clioquinol e seu complexo de platina(IV) [Pt(QI) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].KCl( <b>2</b> ) logo após adição do solvente e após dois dias, em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz.....	122
<b>Figura 7.6</b> - Diagrama molecular do complexo [Pt(QI)Cl(DMSO)] ( <b>1a</b> ).....	122
<b>Figura 7.7</b> - Espectros de massas do complexo [( <i>n</i> -Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em metanol.....	128
<b>Figura 7.8</b> - Espectro no infravermelho do clioquinol e seu complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) obtidos em pastilha de KBr, 4000-400 cm <sup>-1</sup> .....	129
<b>Figura 7.9</b> - Espectros Mössbauer de <sup>119</sup> Sn dos complexos [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) e [SnPh(QI)Cl <sub>2</sub> ].EtOH ( <b>4</b> ) a 80 K.....	131
<b>Figura 7.10</b> - Espectros eletrônicos de HQI, [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) e [SnPh(QI)Cl <sub>2</sub> ].EtOH ( <b>4</b> ).....	132
<b>Figura 7.11</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do clioquinol (HQI) e do complexo [ <i>n</i> [SnPh(QI)Cl <sub>2</sub> ].EtOH ( <b>4</b> ) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz.....	133
<b>Figura 7.12</b> - Mapa de contorno HMBC do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a 300 K, 400 MHz.....	134
<b>Figura 7.13</b> - Mapa de contorno HMBC do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a 300 K, 400 MHz. ....	135
<b>Figura 7.14</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C entre 148-115 ppm do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a 300 K, 400 MHz.....	136
<b>Figura 7.15</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C entre 31-12 ppm do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a 300 K, 400 MHz. ....	137
<b>Figura 7.16</b> - Possíveis estruturas e geometrias adotadas pelo complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ).....	138
<b>Figura 7.17</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H entre 9,2-7,0 ppm do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.....	139
<b>Figura 7.18</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H entre 2,1-0,5 ppm do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.....	140
<b>Figura 7.19</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C entre 151-115 ppm do complexo [ <i>n</i> -(Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl.2H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> ) em CDCl <sub>3</sub> a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.....	140

**Figura 7.20-** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  entre 31-12 ppm do complexo  $[n\text{-}(\text{Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) em  $\text{CDCl}_3$  a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz..... 141

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1-</b> Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	13
<b>Tabela 3.1.1-</b> Dados analíticos obtidos para as tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona.....	31
<b>Tabela 3.1.2-</b> Atribuições das principais absorções na região do infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona.....	31
<b>Tabela 3.1.3-</b> Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm), constante de acoplamento ( $J$ ) e multiplicidade ( $M$ ) dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona (DMSO- $d_6$ , 200 MHz).....	35
<b>Tabela 3.1.4-</b> Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona (DMSO- $d_6$ , 200 MHz).....	37
<b>Tabela 3.2.1-</b> Resumo da coleção de dados e refinamento para HAc3oT (1), HAc3mT (2), HAc3mF (6) e HBz3oT (8).....	40
<b>Tabela 3.3.3-</b> Sinais observados no tratamento com a dose de $2000 \text{ mg kg}^{-1}$ .....	44
<b>Tabela 4.1.1-</b> Cores, rendimentos de reações (Rend.), massas molares (MM), condutividade molar ( $\Lambda_M$ ), análise elementar e temperaturas de fusão para os complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona.....	49
<b>Tabela 4.1.2-</b> Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona e seus complexos de zinco(II).....	53
<b>Tabela 4.1.3-</b> Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), constante de acoplamento ( $J$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) e multiplicidade ( $M$ ) dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ de complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas acetofenona (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz).....	55
<b>Tabela 4.1.4-</b> Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) e multiplicidade ( $M$ ) dos principais sinais de RMN de $^1\text{H}$ de complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz.....	56
<b>Tabela 4.1.5-</b> Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) dos principais sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 dos complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de	

acetofenona (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200 MHz).....	58
<b>Tabela 4.1.6-</b> Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) dos principais sinais de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT 135 dos complexos de tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200 MHz.....	59
<b>Tabela 4.2.1-</b> Resumo da coleção de dados e refinamento dos complexos [Zn(Ac3 <i>m</i> Cl) <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> ) e [Zn(Bz3 <i>m</i> F) <sub>2</sub> ] ( <b>6a</b> ).....	61
<b>Tabela 4.2.2-</b> Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Zn(Ac3 <i>m</i> Cl) <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> ) e [Zn(Bz3 <i>m</i> F) <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> ). Desvio padrão entre parênteses.....	63
<b>Tabela 5.1.1-</b> Dados analíticos obtidos para complexos de ouro(I, III) das tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.....	66
<b>Tabela 5.1.2-</b> Atribuições das principais bandas no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) dos complexos de ouro(I, III) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas.....	71
<b>Tabela 5.1.3-</b> Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) e multiplicidade (M) dos principais sinais de RMN de <sup>1</sup> H dos complexos de ouro(I, III) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas (MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> e DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200MHz.....	76
<b>Tabela 5.2.1-</b> Dados analíticos obtidos para complexos de platina(II, IV) das tiossemicarbazonas derivadas de e 2-acetilpiridina.....	77
<b>Tabela 5.2.2-</b> Atribuições das principais bandas no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) dos complexos platina(II, IV) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas de 2-acetilpiridina.....	81
<b>Tabela 5.2.3-</b> Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) e multiplicidade (M) dos principais sinais de RMN de <sup>1</sup> H dos complexos de platina(II, IV) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200 MHz.....	84
<b>Tabela 5.2.4-</b> Atribuições de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT 135 dos complexos de platina(II, IV) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200 MHz.....	86
<b>Tabela 5.3.1-</b> Resumo da coleção de dados e refinamento dos complexos [Pt(2Ac4 <i>o</i> T)Cl] ( <b>6a</b> ) e [Pt(2Ac4 <i>m</i> T)Cl] ( <b>7a</b> ). Desvio padrão entre parênteses.....	88
<b>Tabela 5.3.2-</b> Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de H2Ac4 <i>o</i> T, [Pt(2Ac4 <i>o</i> T)Cl] ( <b>6a</b> ), H2Ac4 <i>m</i> T e [Pt(2Ac4 <i>m</i> T)Cl] ( <b>7a</b> ). Desvio padrão entre parênteses.....	89

<b>Tabela 5.3.3</b> - Desvios quadráticos médios dos átomos no plano e ângulos entre planos nas estruturas de H <sub>2</sub> Ac <sub>4o</sub> T, [Pt(2Ac <sub>4o</sub> T)Cl] ( <b>6a</b> ), H <sub>2</sub> Ac <sub>4m</sub> T e [Pt(2Ac <sub>4m</sub> T)Cl] ( <b>7a</b> ).....	90
<b>Tabela 5.4.1</b> - Valores de CI <sub>50</sub> para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de ouro(I, III).....	94
<b>Tabela 5.4.2</b> - Valores de CI <sub>50</sub> para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de platina(II, IV).....	96
<b>Tabela 6.1.1</b> - Dados analíticos obtidos para complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de <i>bis</i> (fenilhidrazonas).....	100
<b>Tabela 6.1.2</b> - Atribuições das principais bandas no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (fenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcPh), <i>bis</i> ( <i>para</i> -clorofenil hidrazona) (H <sub>2</sub> AcpClPh) e <i>bis</i> ( <i>para</i> -nitrofenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcpNO <sub>2</sub> Ph).....	102
<b>Tabela 6.1.3</b> - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm), constante de acoplamento ( <i>J</i> ) e multiplicidade ( <i>M</i> ) dos principais sinais de RMN de <sup>1</sup> H dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (fenilhidrazonas) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200 MHz.....	105
<b>Tabela 6.1.4</b> - Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) dos principais sinais de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT135 dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (fenilhidrazonas) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), 200 MHz.....	106
<b>Tabela 6.2.1</b> - Resumo da coleção de dados e refinamento de [Sb(AcpClPh)Cl] ( <b>4a</b> ) e [Bi(AcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl] ( <b>5a</b> ).....	109
<b>Tabela 6.2.2</b> - Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Sb(AcpClPh)Cl] ( <b>4a</b> ) e [Bi(AcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl] ( <b>5a</b> ). Desvio padrão entre parênteses.....	110
<b>Tabela 6.3.1</b> - Valores de CIM para as 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III).....	111
<b>Tabela 6.3.2</b> - Valores de inibição (%) a 100 $\mu$ M para os complexos de Sb(III) de <i>bis</i> (fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina.....	112
<b>Tabela 6.3.3</b> - Atividade citotóxica (CI <sub>50</sub> ) das 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) contra linhagens de células Jurkat, HL-60, MCF-7, HCT-116 e PBMC.....	114
<b>Tabela 7.1.1</b> - Dados analíticos obtidos para os complexos de platina(II, IV) com clioquinol.....	118

<b>Tabela 7.1.2</b> - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos de platina(II, IV).....	119
<b>Tabela 7.1.3</b> - Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm), multiplicidade (M) e constante de acoplamento ( $J$ ) dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ do clioquinol e seus complexos de platina(II) em $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.....	121
<b>Tabela 7.1.2.1</b> - Resumo da coleção de dados e refinamento do complexo $[\text{Pt}(\text{QI})\text{Cl}(\text{DMSO})]$ ( <b>1a</b> ).....	124
<b>Tabela 7.1.2.3</b> - Distâncias ( $\text{Å}$ ) e ângulos ( $^\circ$ ) entre os átomos selecionados de $[\text{Pt}(\text{QI})\text{Cl}(\text{DMSO})]$ ( <b>1a</b> ). Desvio padrão entre parênteses.....	125
<b>Tabela 7.1.3.1</b> - Valores de $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) do clioquinol e seus complexos de platina(II,IV) contra leucemia HL-60.....	126
<b>Tabela 7.2.1</b> - Dados analíticos obtidos para os complexos organoestânicos com clioquinol.....	127
<b>Tabela 7.2.2</b> - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos organoestânicos de clioquinol .....	129
<b>Tabela 7.2.3</b> - Parâmetros hiperfinos Mössbauer dos complexos organoestânicos de clioquinol e alguns sais usados como referência.....	131
<b>Tabela 7.2.4</b> - Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ do clioquinol e seus complexos de organoestânicos em $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.....	133
<b>Tabela 7.2.6</b> - Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$ ppm) sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 do clioquinol livre e seus complexos organoestânicos ( $\text{CDCl}_3$ ), 400 MHz.....	137
<b>Tabela 7.2.2.1</b> - Valores de CIM em $\mu\text{M}$ para o clioquinol livre e seus complexos organoestânicos.....	141
<b>Tabela 7.2.2.2</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{M}$ frente às diferentes espécies de <i>Candida sp</i> .....	142
<b>Tabela 7.2.2.3</b> - Concentração inibitória fracionária (CIF) frente a diferentes cepas de <i>C. albicans</i> .....	144

## LISTA DE ABREVIATURAS

M. M.	Massa Molar
dec.	Decompõe
$\epsilon$	Absortividade molar
calc	Calculado
TG	Análise termogravimétrica
RMN $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN $^{119}\text{Sn}$	Ressonância Magnética Nuclear de Estanho 119
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
MHz	MegaHertz
↑	Convenção no DEPT 135 para CH e CH <sub>3</sub>
↓	Convenção no DEPT 135 para CH <sub>2</sub>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	4, 4-Dimetilformamida
MeOH	Metanol
MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub>	Acetona deuterada
TMS	Tetrametilsilano
M	Multiplicidade
t	Tripleto
s	Simpleto
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
q	Quarteto

m	Multiplero
$\alpha(N)$ -	Cadeia lateral no C(2) do anel piridínico
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma de mama
T-98	Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano
U-87	Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica aguda
Jurkat	Linhagem de células de leucemia de linfócitos T
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-nitrobenzólico)
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzólico
CIM	Concentração inibitória mínima
CIF	Concentração inibitória fracionária
BHI	Infusão Cérebro Coração
ATCC	American Type Culture Collection
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Química Inorgânica Medicinal.....	1
1.1.2 Tiossemicarbazonas como candidatos a fármacos para a remoção de metais.....	7
1.1.3 Complexos de tiossemicarbazonas como agentes citotóxicos frente a células tumorais humanas.....	7
1.1.4 Complexos metálicos de <i>bis</i> (hidrazonas) como candidatos a agentes antimicrobianos e antitumorais.....	8
1.1.5 Complexos de Clioquinol com platina(II, IV) e estanho(IV) como candidatos a fármacos antitumorais e antimicrobianos.....	9
1.2 Objetivos.....	11
<b>Capítulo 2- Parte Experimental.....</b>	<b>12</b>
2.1 Equipamentos e procedimentos.....	12
2.1.1 Determinação de temperaturas de fusão.....	12
2.1.2 Pesagens.....	12
2.1.3 Análise Elementar.....	12
2.1.4 Análises Térmicas.....	12
2.1.5 Espectroscopia Mössbauer de <sup>119</sup> Sn.....	12
2.1.6 Espectroscopia no Infravermelho.....	12
2.1.7 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.....	12
2.1.8 Análises Condutimétricas.....	13
2.1.9 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	13

2.1.10 Espectroscopia eletrônica no Ultravioleta-Visível.....	13
2.1.11 Espectrometria de Massas.....	13
2.1.12 Cristalografia por Difração de Raios X.....	13
2.2 Reagentes e solventes.....	14
2.3 Meios de cultura.....	14
2.4 - Síntese dos ligantes e complexos.....	14
2.4.1 Síntese de acetofenona- e benzofenona- <i>N</i> (3)-orto <i>N</i> (3)-meta, <i>N</i> (3)- <i>para</i> -toluil tiossemicarbazonas (HAc3oT, HAc3mT e HAc3pT, HBz3oT, HBz3mT e HBz3pT) e acetofenona e benzofenona <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -clorofenil, <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -flúorfenil, e <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -nitrofenil tiossemicarbazonas (HAc3mCl, HAc3mF, HBz3mNO <sub>2</sub> , HBz3mCl, HBz3mF e HBz3mNO <sub>2</sub> ).....	15
2.4.2 Síntese dos complexos de zinco(II) de acetofenona- e benzofenona- <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -clorofenil, <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -flúorfenil, <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -nitrofenil e <i>N</i> (3)- <i>meta</i> -toluil tiossemicarbazonas.....	15
2.4.3 Síntese dos complexos de ouro(I, III), platina(II, IV) de 2-formilpiridina-, 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>orto</i> , <i>N</i> (4)- <i>meta</i> e <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil tiossemicarbazonas.....	16
2.4.4 Síntese de 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (fenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcPh) e seus derivados <i>bis</i> ( <i>para</i> -clorofenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcpClPh) e <i>bis</i> ( <i>para</i> -nitrofenilhidrazona)(H <sub>2</sub> AcpNO <sub>2</sub> Ph).....	17
2.4.5 Síntese dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina- <i>bis</i> (fenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcPh) e seus derivados <i>bis</i> ( <i>para</i> -clorofenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcpClPh) e <i>bis</i> ( <i>para</i> -nitrofenilhidrazona) (H <sub>2</sub> AcpNO <sub>2</sub> Ph).....	18
2.4.6 Síntese dos complexos organoestânicos e de platina(II,IV) de clioquinol.....	18
2.5 Atividade Biológica.....	19
2.5.1.1 Atividade antimicrobiana.....	19
2.5.1.2 Atividade antifúngica utilizando o método de microdiluição.....	20
2.5.2 Atividade contra leishmaniose antimicrobiana.....	21
2.5.3 Atividade Citotóxica.....	22
Atividade citotóxica – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.....	23
Atividade citotóxica – Departamento de Fisiologia da UFMG.....	23
2.5.4 Estudos de interação com ADN plasmidial .....	25

2.5.5 Estudos de inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) .....	25
2.5.6 Avaliação da toxicidade aguda in vivo.....	26
<b>Capítulo 3- Tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona como agentes quelantes para potencial uso em medicina.....</b>	<b>29</b>
3.1- Análises de acetofenona- <i>N(3)-meta</i> -clorofenil-, <i>N(3)-meta</i> -flúorfenil- e <i>N(3)-meta</i> -nitrofenil- tiossemicarbazonas (HAc3mCl, HAc3mF, HAc3mNO <sub>2</sub> ) e benzofenona- <i>N(3)-meta</i> -clorofenil-, <i>N(3)-meta</i> -flúorfenil-, <i>N(3)-meta</i> -nitrofenil-, <i>N(3)-orto</i> -toluil- e <i>N(3)-meta</i> -toluil- tiossemicarbazonas (HBz3mCl, HBz3mF e HBz3mNO <sub>2</sub> , HBz3oT e HBz3mT).....	30
Espectrometria no Infravermelho.....	31
Ressonância Magnética Nuclear.....	33
Espectroscopia eletrônica.....	38
3.2- Cristalografia por Difração de Raios X.....	38
3.3- Atividade Biológica.....	42
3.3.1 Atividade antimicrobiana.....	42
3.3.2 Atividade citotóxica.....	42
3.3.3 Toxicidade aguda.....	43
<b>Capítulo 4- Complexos de zinco(II) de acetofenona- e benzofenona-tiossemicarbazonas: uso de tiossemicarbazonas para remoção de zinco(II) em doenças neuro-degenerativas.....</b>	<b>48</b>
4.1- Análises dos complexos de zinco(II) de <i>N(3)-m</i> -clorofenil-, <i>N(3)-m</i> -flúorfenil-, <i>N(3)-m</i> -nitrofenil- e <i>N(3)-m</i> -toluil- acetofenona- e benzofenona-, tiossemicarbazonas.....	48
Espectroscopia eletrônica.....	50
Espectrometria no Infravermelho.....	50
Ressonância Magnética Nuclear.....	53
4.2 - Cristalografia por Difração de Raios X.....	60

4.3 - Atividade Biológica.....	63
<b>Capítulo 5- A investigação da atividade citotóxica e de mecanismos de ação de complexos de ouro(I, III) e platina(II, IV) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.....</b>	<b>64</b>
5.1- Complexos de ouro(I, III) de <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil 2-formilpiridina tiossemicarbazona-, <i>N</i> (4)- <i>orto</i> , <i>N</i> (4)- <i>meta</i> e <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil 2-acetilpiridina- tiossemicarbazona e de <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona.....	65
5.1.1 - Análises dos complexos de ouro(I, III) .....	65
Espectrometria no Infravermelho dos complexos de ouro(I, III) .....	68
Ressonância Magnética Nuclear dos complexos de ouro(I, III) .....	72
5.2- Complexos de platina(II, IV) com <i>N</i> (4)- <i>orto</i> -, <i>N</i> (4)- <i>meta</i> - e <i>N</i> (4)- <i>para</i> -toluilitiossemicarbazonas de 2-acetilpiridina.....	77
5.2.1- Análises dos complexos de platina(II) e platina(IV) .....	77
Espectrometria no Infravermelho dos complexos de platina(II, IV).....	78
Ressonância Magnética Nuclear dos complexos de platina(II, IV).....	82
5.3- Cristalografia por Difração de Raios X.....	87
5.4- Atividade Citotóxica.....	91
5.4.1- Investigação da atividade citotóxica dos complexos de platina (II, IV) em linhagens celulares de tumores sólidos MCF-7, e de leucemias HL60 e Jurkat.....	91
5.4.2- Investigação da atividade citotóxica dos complexos de platina (II, IV) e de ouro(I, III) em linhagens de glioblastoma U-87 e T-98.....	93
5.4.3- Avaliação do mecanismo de ação citotóxica.....	96
5.4.3.1- Inibição da atividade enzimática da Tiorredoxina redutase (TrxR) .....	96
5.4.3.2- Interação com ADN plasmidial.....	98
<b>Capítulo 6- Investigação do perfil farmacológico de complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de bis(fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina .....</b>	<b>99</b>
6.1 - Análises dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina	100

<i>bis</i> (fenilhidrazona), <i>bis</i> ( <i>para</i> -clorofenilhidrazona) e <i>bis</i> ( <i>para</i> -nitrofenilhidrazona).....	
Espectrometria no Infravermelho.....	101
Espectroscopia eletrônica.....	104
Ressonância Magnética Nuclear.....	104
6.2- Cristalografia por Difração de Raios X.....	107
6.3 - Atividade biológica.....	110
6.3.1- Atividade antimicrobiana.....	110
6.3.2- Atividade contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> dos complexos de antimônio(III) .....	112
6.3.4- Atividade citotóxica.....	112
6.3.5- Investigação do potencial pró-apoptótico das <i>bis</i> (fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III).....	114
<b>Capítulo 7- Investigação sobre as bioatividades de complexos de platina(II, IV) e de estanho(IV) de clioquinol.....</b>	<b>117</b>
7.1.1- Análises dos complexos de platina(II, IV).....	117
Espectrometria no Infravermelho dos complexos de platina(II, IV).....	118
Ressonância Magnética Nuclear.....	120
7.1.2 - Cristalografia por Difração de Raios X.....	122
7.1.3- Atividade citotóxica.....	125
7.2.1- Análises dos complexos de organoestânicos.....	127
Espectroscopia no Infravermelho dos complexos organoestânicos.....	128
Espectroscopia Mössbauer de <sup>119</sup> Sn.....	130
Espectroscopia eletrônica dos complexos organoestânicos.....	131
Ressonância Magnética Nuclear dos complexos organoestânicos.....	132
7.2.2- Atividade Biológica.....	141
7.2.2.1- Atividade antimicrobiana utilizando o método de macrodiluição.....	141
7.2.2.2- Atividade antifúngica utilizando o método de microdiluição.....	142
7.2.2.3- Teste de combinação terapêutica.....	143
<b>Capítulo 8- Discussão e conclusões.....</b>	<b>145</b>
Anexos.....	154

## Introdução

### 1.1. 1 Química Inorgânica Medicinal

A Química Inorgânica Medicinal se desenvolve basicamente em três ramos conceituais: a introdução de íons metálicos no sistema biológico, a manipulação e redistribuição de íons metálicos dentro do sistema, e a remoção dos íons metálicos do sistema.<sup>1</sup>

No corpo humano, alguns íons metálicos exercem funções importantes e já bem conhecidas como a função estrutural, as funções de carregar e transportar elétrons e oxigênio, a função de catalisadores em reações de oxi-redução e ácido-base dentre outras reações. Por exemplo, sódio e potássio, que se ligam fracamente aos ligantes orgânicos, são ideais para gerar gradientes iônicos através de membranas e para a manutenção do equilíbrio osmótico. Já os íons magnésio(II) e cálcio(II) desempenham papéis estruturais importantes, e, no caso particular do cálcio(II), serve como um transportador de carga e como um gatilho para a transmissão de sinais. Íons de ferro e cobre, que se ligam fortemente aos ligantes orgânicos, participam de inúmeras reações redox, além de desempenharem um papel importante no transporte de oxigênio.<sup>2</sup>

Uma característica dos metais que os torna tão importantes como componentes (funcionais e estruturais) dos seres vivos é a sua habilidade em perder elétrons facilmente formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas. Enquanto íons metálicos apresentam-se deficientes de elétrons, biomoléculas tais como proteínas e ADN são ricas em elétrons. A atração entre essas cargas opostas leva a uma tendência geral de “íons metálicos interagirem com moléculas biológicas”.<sup>3</sup>

Mesmo sem esse conhecimento sobre a presença e funções de metais no sistema biológico, já se fazia o uso de certos metais na medicina há quase 5000 anos. Vários fármacos à base de ferro eram usados no Egito cerca de 1500 aC. Nessa mesma época foi descoberto que o zinco promovia cura de feridas. As primeiras referências da utilização do ouro como agente terapêutico surgiram na medicina chinesa e árabe por volta de 3000 a.C, em que ouro era usado como elixir da vida. No fim do século XIX, Robert Koch demonstrou os efeitos citotóxicos *in vitro* de sais de ouro ( $K[Au(CN)_2]$ ) contra o bacilo da tuberculose.<sup>4</sup>

Porém, somente nos últimos cem anos as propriedades medicinais de compostos inorgânicos começaram a ser investigadas de forma racional, com o emprego de compostos de ouro no tratamento de artrite reumatóide, dos antimoniais para o tratamento de leishmaniose e de compostos à base de arsênio para o tratamento da sífilis.<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> L.E. Scott, C. Orvig, Chem. Rev. 109 (2009) 4885.

<sup>2</sup> E. Ochiai, J. Chem. Educ. 55 (1978) 631.

<sup>3</sup> A.M C. Benite, S.P. Machado, E.J. Barreiro, Quim. Nova. 30 (2007) 2062.

<sup>4</sup> C. Orvig, M.J. Abrams, Chem. Rev. 99 (1999) 2201.

A Química Inorgânica Medicinal em sua forma atual teve suas origens nos trabalhos de Paul Ehrlich, que fez uso de complexos metálicos, em especial os de arsênio, na preparação de drogas para o tratamento da sífilis. No entanto, foi com a descoberta feita pelo físico Barnett Rosenberg, em 1965, das propriedades antitumorais do *cis*[(diaminodicloro)platina(II)], *cis*[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (Figura 1.1), o chamado “cisplatina”, que a Química Inorgânica Medicinal garantiu seu sucesso, uma vez que a partir do uso clínico do composto, em 1978, o número de mortes por tumor de testículo diminuiu cerca de 80%<sup>5</sup>. A partir daí, o interesse em pesquisas por complexos metálicos com propriedades farmacológicas, na investigação de mecanismos de ação e tentativas de melhorar a atividade têm sido alvo intenso de estudo.

Atualmente, a cisplatina ainda é um dos agentes mais efetivos utilizados contra câncer de testículo, ovário e pescoço, sendo um coadjuvante no tratamento do câncer de pulmão; porém seu uso apresenta muitas barreiras como o desenvolvimento de resistência celular e a os sérios efeitos colaterais que aparecem durante o tratamento com cisplatina. Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de sintetizar compostos análogos a cisplatina que possam ultrapassar essas barreiras<sup>6</sup>. Três compostos foram aprovados para a comercialização: carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina (ver Figura 1.1).

O mecanismo de ação da cisplatina está relacionado com a inibição seletiva da síntese de ADN. O ADN é uma macromolécula composta por blocos repetitivos, cada um deles constituído de uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma molécula do açúcar 2'-desoxi-D-ribose. O alvo principal de ligação da platina na fita de ADN é o nitrogênio da guanina ou adenina (bases nitrogenadas púricas).<sup>6</sup>

Os efeitos citotóxicos de muitos compostos são atribuídos à capacidade em formar ligações cruzadas (“cross-link”) com o ADN, seja por ligação interfitas ou intrafitas. Essas ligações mudam a conformação do ADN, inibindo sua síntese, e provocando assim a morte celular. A forma mais citotóxica é a ligação intrafitas. A cisplatina produz preferencialmente ligações intrafitas com o ADN e os mecanismos de resistência à cisplatina podem ocorrer pelo rápido reparo de adutos cisplatina-ADN.<sup>7</sup>

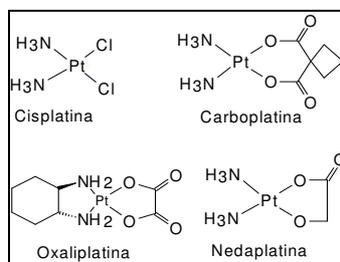


Figura 1.1 – Estrutura da cisplatina e seus análogos carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.

<sup>5</sup> H. Beraldo, Quím. Nova. 27 (2004) 461.

<sup>6</sup> A.P.S. Fontes, S.G. Almeida, L.A. Nader, Quím. Nova. 4 (1997) 20.

<sup>7</sup> THURSTON, D. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. Boca Ratom: CRC Press. p. 62-64, 2007.

Compostos de platina(IV) são bastante promissores na quimioterapia, pois são mais solúveis em água e mais estáveis em meio ácido, podendo ser administrados oralmente. Comparados aos complexos de platina(II), os complexos de platina(IV) são geralmente menos ativos quando submetidos a testes de atividade *in vitro*. Uma vez que os complexos de platina(IV) passam por reações de substituição dos ligantes mais lentamente que seus análogos de platina(II), acredita-se que sua atividade antitumoral se manifeste após sua redução, *in vivo*, ao derivado de platina(II).<sup>8</sup>

Complexos de ouro são bem conhecidos na área farmacêutica, com principal aplicação clínica no tratamento de artrite reumatóide. Entre os complexos de ouro anti artríticos pode-se citar o 1-tio- $\beta$ -glucanopiranosose 2,3,4,6-tetraacetato-S)ouro(I) trietilfosfina (auranofina), o aurotiomalato (Myocrisin<sup>®</sup>) e o aurotioglucose (Solgonal<sup>®</sup>). Compostos de ouro também podem apresentar atividade citotóxica frente a células tumorais. Complexos tetraédricos de ouro(I) de 1,2-bis(difenilfosfinoetano) e 1,2-(dipiridilfosfinoetano) apresentam um amplo espectro de atividade antitumoral *in vivo*, especialmente em algumas linhagens de células resistentes a cisplatina<sup>9</sup>. Pesquisas revelam que esses compostos provocam lesões na mitocôndria levando à morte celular.<sup>10</sup>

Complexos de ouro(III) têm o centro metálico isoeletrônico ( $5d^8$ ) e isoestrutural (quadrático) com a platina(II) e por isso se mostram como bons candidatos na terapia contra o câncer. A maioria dos compostos de ouro(III) com ligantes multidentados, tais como etilenodiamina e biperidina, são ativos contra diferentes linhagens de células tumorais humanas; um estudo *in vitro* mostrou que o complexo de ouro(III)  $[\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]\text{PF}_6$  é ativo contra diferentes linhagens celulares tumorais. Estudos de mecanismos indicaram que o ADN não é o alvo celular primário para a ação antitumoral desse complexo<sup>9</sup>. Complexos de ouro tem demonstrado grande atividade de inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), uma enzima que participa do ciclo de reações redox no qual a RDR também está envolvida, convertendo ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos.<sup>11,12</sup>

A literatura é rica em estudos de outras atividades de compostos metálicos, tais como as atividades antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e antitumoral<sup>13,14,15</sup>. Entre os metais representativos, antimônio, bismuto e estanho mostram uma ampla faixa de bioatividades. Como exemplo, compostos de bismuto(III) são amplamente usados na clínica contra distúrbios gastrointestinais. Alguns exemplos são o subsalicilato de bismuto (BSS, Pepto-Bismol<sup>®</sup>) e o subcitrato

<sup>8</sup> A.P.S. Fontes, E.T. César, H. Beraldo, Quím. Nova Escola. 6 (2005) 13.

<sup>9</sup> C.X. Zhang, S. Lippard, Current Opin. Chem. Biol. 7 (2003) 481.

<sup>10</sup> BERTINI, Ivano. Biological Inorganic Chemistry: *Structure and Reactivity*. US: University Science Books, 2006, p.109-110.

<sup>11</sup> A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1692.

<sup>12</sup> J.A. Lessa, J.C. Guerra, L.F. de Miranda, C.F.D. Romeiro, J.G. Da Silva, I.C. Mendes, N.L. Speziali, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1729.

<sup>13</sup> I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron. 26 (2007) 3263.

<sup>14</sup> X. Wanga, Z. Guo, Dalton Trans. (2008) 1521.

<sup>15</sup> E.R.T. Tiekink, Critical Rev. Oncol./Hematol. 42 (2002) 217.

de bismuto ranitidino (RBC, Pylorid<sup>®</sup>). Compostos de bismuto(III) são usados em associação com antibióticos no tratamento de infecções pela bactéria *Helicobacter pylori*, um agente patogênico que provoca sérios problemas gástricos. *H. pylori* também pode provocar linfoma gástrico e sua erradicação do organismo leva à regressão da doença e, algumas vezes, à cura. Além disso, a administração sinérgica de compostos de bismuto com cisplatina é utilizada para reduzir seus os efeitos colaterais. Na literatura, encontram-se compostos de bismuto(III) com atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral, o que torna o bismuto um metal de grande interesse na Química Medicinal.<sup>15</sup>

Da mesma forma que os complexos de bismuto(III), complexos de antimônio(III) são de grande interesse quanto ao seu perfil farmacológico. Os compostos de antimônio(V), estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>), são utilizados clinicamente contra leishmaniose. A leishmaniose é provocada pelos protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de mosquitos e se manifesta com lesões cutâneas e viscerais. Estudos mostram que a atividade anti-*leishmania* está relacionada com a redução de antimônio(V) a antimônio(III) *in vivo*<sup>16</sup>. Uma série de compostos de antimônio(III) com ácidos carboxílicos polidentados também têm sido investigados por seu potencial antitumoral. Os resultados preliminares indicam que a coordenação de antimônio(III) por estes ligantes resulta em compostos mais potentes que seus ligantes livres, indicando a importância da presença de antimônio(III) para a atividade.<sup>15</sup>

A atividade antimicrobiana de compostos de antimônio(III) tem sido igualmente demonstrada em diversos trabalhos da literatura<sup>17,18</sup>. Esses resultados tornam ainda mais interessante a investigação do espectro de atividades farmacológicas de compostos de antimônio(III).

Complexos organoestânicos são conhecidos pelas suas múltiplas aplicações como agentes antimicrobianos e biocidas<sup>19</sup>. A literatura contém ainda inúmeros trabalhos a respeito da atividade citotóxica de compostos de estanho contra células tumorais.

A coordenação de ligantes bioativos pode melhorar a sua ação, enquanto que ligantes inativos podem adquirir propriedades farmacológicas. Além disso, complexos metálicos têm se revelado bons inibidores de enzimas já que podem ligar-se fortemente às enzimas (por meio de ligações covalentes e iônicas), impedindo a interação do substrato ou perturbando o sítio ativo, ou promovendo perturbações nos metais que são essenciais para a ação enzimática.<sup>20</sup>

A coordenação a metais pode provocar mudanças significativas no perfil farmacológico de diversos compostos orgânicos, seja pela modificação na lipofilia (propriedade relacionada à

<sup>16</sup> F. Frézard, C. Demicheli, C.S. Ferreira, M.P. Costa, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 913.

<sup>17</sup> N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1176.

<sup>18</sup> K. Mahajan, M. Swami, R.V. Singh, *Rus. J. Coord. Chem.* 35 (2009) 179.

<sup>19</sup> A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Costa, N.L. Speziali, H. J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

<sup>20</sup> B. Bottari, R. Maccari, F. Monforte, R. Ottana, M.G. Vigorita, G. Bruno, F. Nicolo, A. Rotondo, E. Rotondo, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 2203.

capacidade de um composto em atravessar a membrana celular), tornando o complexo mais ativo que o ligante livre, pela alteração nos efeitos colaterais ou pela redução da resistência celular. A coordenação a ligantes orgânicos pode facilitar a entrada do metal para o interior da célula por aumento de lipofilia.

A complexação também pode servir como um mecanismo de remoção de metais tóxicos ou que se encontrem em excesso no organismo. Dessa forma, o uso de ligantes pouco ativos biologicamente parece interessante.

Com o envelhecimento da população mundial, sabe-se que há hoje uma grande necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para a terapia de doenças neurodegenerativas. A destruição progressiva e irreversível das células neuronais que provoca sintomas gradativos com a perda de funções motoras, fisiológicas e/ou sua capacidade cognitiva são os principais danos causados por esse tipo de doenças<sup>21</sup>. Pesquisas mostram evidências da participação de íons metálicos em desordens como a Doença de Alzheimer e o mal de Parkinson, embora suas reais etiologias sejam ainda pouco compreendidas<sup>22</sup>. Dessa forma, uma abordagem terapêutica para o tratamento envolveria o planejamento de agentes quelantes não tóxicos que pudessem remover metais do cérebro dos pacientes.

Os agentes quelantes estão classificados na terapia da Doença de Alzheimer como inibidores de agregação da proteína  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A). Excessos de agregados ou placas de  $\beta$ A no cérebro são uma das principais causas do desenvolvimento da Doença de Alzheimer, e têm sido associados ao acúmulo de metais como o cobre, o zinco e o ferro<sup>1</sup>. Estudos em cérebros *post mortem* de pacientes acometidos pela doença mostram a presença de metais como o cobre e o zinco em placas de amilóides<sup>23</sup>. Portanto, algumas propriedades são importantes para que um composto quelante seja um potencial fármaco no tratamento da Doença de Alzheimer: não apresentar toxidez, ter um baixo peso molecular, ser neutro ou fracamente carregado a fim de facilitar a passagem pela barreira hemato-encefálica, e ser estável.<sup>24</sup>

Muitos são os desafios encontrados no tratamento de pacientes com Doença de Alzheimer, pois ainda não existe cura. Os fármacos atualmente aprovados (com ações antiinflamatória, antioxidante, antidepressiva e inibidores de enzimas envolvidas na produção de  $\beta$ A) melhoram os sintomas por um curto período de tempo, mas não impedem a progressão da doença.<sup>25</sup>

Nesse sentido, o estudo de compostos quelantes, que sejam pouco tóxicos e complexem íons metálicos torna-se interessante como uma estratégia para o desenvolvimento de potenciais agentes

<sup>21</sup> S. Rivera-Mancía, I. Pérez-Neri, C. Ríos, L. Tristán-López, L. Rivera-Espinos, Sergio Montes, Chem-Biol. Interact. 186 (2010) 184.

<sup>22</sup> L.E. Scott, M. Telpoukhovskaia, C. Rodríguez-Rodríguez, M. Merkel, M.L. Bowen, B.D.G. Page, D.E. Green, T. Storr, F. Thomas, D.D. Allen, P.R. Lockman, B.O. Patrick, M.J. Adam, C. Orvig, Chem. Sci. 2 (2011) 642.

<sup>23</sup> A. Sereniki, M.A.F. Vital, Rev. Psiquiatr. RS. (2008) 30.

<sup>24</sup> A. Budimir, Acta Pharm. 61 (2011) 1.

<sup>25</sup> A. Rauk, Chem. Soc. Rev. 38 (2009) 2698.

terapêuticos no tratamento de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas provocadas pelo acúmulo de metais.

Tiossemicarbazonas (Figura 1.2) são compostos obtidos pela reação de condensação de um aldeído ou uma cetona com uma tiossemicarbazida. Geralmente, apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, já que, com exceção da água que é liberada na sua obtenção, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final.<sup>26</sup>

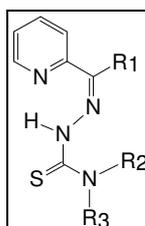


Figura 1.2 – Estrutura genérica das tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -piridínicas.

As tiossemicarbazonas têm grande capacidade quelante, tanto na forma neutra quanto na forma aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometínico (C=N). Esta capacidade aumenta com a adição de grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina. O caráter mono, bi ou tridentado da tiossemicarbazona bem como sua geometria, sua capacidade em formar ligações de hidrogênio e seus grupos funcionais potencialmente ativos são fatores que influenciam em sua reatividade.<sup>14</sup>

Tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos apresentam uma ampla faixa de atividades biológicas e podem atuar como agentes antitumorais, antimicrobianos e antiparasitários. A coordenação de tiossemicarbazonas a metais como platina(II), platina(IV), ouro(I) e ouro(III), como proposto no presente trabalho, em princípio poderia dar origem a complexos que reuniriam em um único composto, o metal e o ligante com atividade citotóxica/antitumoral e capazes de interagir com alvos diferentes no organismo.

*Bis*(hidrazonas) são agentes quelantes polidentados que têm afinidade por diferentes cátions metálicos. A complexação desses ligantes com bismuto(III) e antimônio(III), como realizado neste estudo, poderia resultar em complexos com interessante perfil farmacológico

5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina é um derivado halogenado da 8-hidroxiquinolina que foi usado entre 1950-1970 como um agente oral antiparasitário para a prevenção e tratamento da amebíase intestinal, mas seu mecanismo de ação como um agente antimicrobiano era desconhecido. Na década de 1970, o clioquinol oral foi retirado do mercado, devido à sua neurotoxicidade. No entanto, as formulações tópicas de clioquinol ainda estão disponíveis para o tratamento de infecções por fungos e parasitas<sup>27</sup>. Além de seu potencial como antibiótico, o clioquinol também tem mostrado efeito contra a proliferação de células cancerosas. Um estudo revelou que o mecanismo exercido pelo clioquinol

<sup>26</sup> R.P. Tenório, A.J. S. Góes, J.G. Lima, A.R. Faria, A.J. Alves, T.M. Aquino, *Quim. Nova.* 28 (2005) 1030.

<sup>27</sup> X. Mao, A.D. Schimmer, *Toxicol. Let.* 182 (2008) 1.

envolve vias apoptóticas<sup>28</sup>. O tratamento com clioquinol reduziu a viabilidade de oito linhagens de células tumorais humanas, com baixos valores de IC<sub>50</sub><sup>29</sup>. Sendo assim complexos de clioquinol com estanho, como desenvolvido no presente estudo, poderiam apresentar-se como candidatos a fármacos antifúngicos. Complexos de clioquinol com platina(II) e platina(IV), por outro lado, seriam interessantes de investigar quanto às suas propriedades citotóxicas frente a células tumorais.

### 1.1.2 Tiossemicarbazonas como candidatos a fármacos para a remoção de metais

De modo geral observa-se que a diminuição na capacidade quelante de tiossemicarbazonas provoca uma redução em suas atividades biológicas. De fato, tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas mostram-se mais ativas como agentes citotóxicos que tiossemicarbazonas que podem agir como sistemas bidentados.<sup>5</sup>

Desse modo tiossemicarbazonas com caráter bidentado reuniriam importantes propriedades para serem consideradas como candidatos a fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas cuja etiologia esteja associada ao acúmulo de metais: seriam menos tóxicas, de fácil obtenção e teriam afinidade por zinco(II) e cobre(II). Estes íons metálicos parecem estar presentes em excesso em cérebros de pacientes com a Doença de Alzheimer

Zinco(II) é um íon metálico essencial para inúmeros processos celulares e pode ser importante na regulação do metabolismo das células. Além disso, a literatura mostra que zinco(II) apresenta alta afinidade por resíduos de histidina, que interagem entre si impedindo a formação de fibrilas de  $\beta A$ , principais responsáveis pela a patogenicidade da Doença de Alzheimer.<sup>1,30</sup>

### 1.1.3 Complexos de tiossemicarbazonas como agentes citotóxicos frente a células tumorais humanas

Como foi mencionado, tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas agem como quelantes tridentados e mostram altos índices de atividade citotóxica<sup>31,45</sup>. As tiossemicarbazonas agem, geralmente, como inibidores de enzimas. Tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas encontram-se entre os inibidores mais potentes da atividade da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) envolvida na biossíntese do ADN.

Mudanças na atividade da RDR podem provocar alterações na velocidade de mutação espontânea das células. Se o aumento na atividade dessa enzima encontra-se associado ao surgimento de doenças e, em particular ao câncer, então a RDR torna-se um alvo interessante para a quimioterapia. A enzima é formada por duas subunidades, R1 e R2. Em R1 encontram-se o sítio

<sup>28</sup>A.Y. Shaw, C.Yi Chang, M.Y. Hsu, P.J. Lu, C.N. Yang, H.L. Chen, C.W. Lo, C.W. Shiau, M.K. Chern, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2860.

<sup>29</sup>W.Q. Ding, B. Liu, J.L. Vaught, H. Yamauchi, S.E. Lind, Cancer Res. 65 (2005) 3389.

<sup>30</sup>S. Bolognin, L. Messori, D. Drago, C. Gabbiani, L. Cendron, P. Zatta, Int. J. Biochem. Cell B. 43 (2011) 877.

<sup>31</sup>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.

catalítico, o sítio de especificidade e o sítio ativo, enquanto que a R2 contem dois íons  $\text{Fe}^{3+}$  ligados entre si através de uma ponte  $\mu$ -oxo e um radical livre tirosila.<sup>5</sup>

Em nosso grupo, foram estudados os complexos de ferro(II) e ferro(III) de tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas, com o objetivo de investigar mais detalhadamente o mecanismo de ação e foi proposto que esse mecanismo 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 celular.<sup>5,32</sup>

No presente trabalho os efeitos citotóxicos de complexos ouro(I, III) e de platina(II, IV) de tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas foram investigados. Na literatura são raros os estudos sobre o comportamento biológico de complexos de platina(IV) de tiossemicarbazonas e portanto, a investigação da ação antitumoral desses compostos é uma inovação nessa área. Compostos de platina(IV) permanecem em elevados estados de oxidação na corrente sanguínea e sua baixa reatividade aumenta o tempo de vida da forma ativa do fármaco (evitando a formação de outros compostos). Há ainda uma menor incidência de reações colaterais indesejáveis com complexos de platina(IV) em relação aos de platina(II).<sup>33</sup>

#### *1.1.4 Complexos metálicos de bis(hidrazonas) como candidatos a agentes antimicrobianos e antitumorais*

Hidrazonas são ligantes versáteis de fácil obtenção que possuem diversas aplicações farmacológicas como agentes antimicrobianos, anticonvulsivantes, analgésicos, antitumorais<sup>34</sup>. *Bis*(hidrazonas) são agentes complexantes com aplicações em química analítica. A introdução de um fragmento heterocíclico (piridina, furano, tiofeno, etc) na molécula de *bis*(hidrazona) aumenta o número de centros de doação, tornando mais eficaz a aplicação de tais ligantes como agentes quelantes.<sup>35</sup>

Os complexos metálicos de hidrazonas apresentam igualmente diferentes propriedades farmacológicas como agentes antimicrobianos, antituberculose e antitumorais<sup>36,37</sup>. Pavan e colaboradores<sup>36</sup> mostram que hidrazonas derivadas de di-2-piridilcetona apresentam atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* semelhante às dos compostos de referência tais como a estreptomicina, ciprofloxacina e ácido *p*-aminossalicílico. Sugeriu-se que a atividade dessa classe de compostos está

<sup>32</sup> R.U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 65 (1997) 267.

<sup>33</sup> A.K. Mishra, S.B. Mishra, N. Manav, R. Kumar, Sharad, R. Chandra, D. Saluja, N.K. Kaushik, Spectrochim. Acta Part A. 66 (2007) 1042.

<sup>34</sup> S.Chandra, A.K. Sharma, J. Coord. Chem. 62 (2009) 3688 .

<sup>35</sup> L.D. Popov, A.N. Morozov, I.N. Shcherbakov, Y.P. Tupolova, V.V. Lukov, V.A. Kogan, Rus. Chem. Rev. 78 (2009) 643.

<sup>36</sup> F.R. Pavan, P.I. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Deflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 1898.

<sup>37</sup> N. Nawar, N.M. Hosny, Chem. Pharm. Bull. 47 (1999) 944.

relacionada à sua capacidade em ligar-se ao ferro intracelular, que é essencial para a micobactéria<sup>38</sup>. Outro estudo realizado por Chandra e Sharma<sup>19</sup> mostra que a atividade contra *Alternaria brassicae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas compestris*, e *Pseudomonas aeruginosa* foi aumentada com a coordenação de 2,6-diacetilpiridina *bis*(tiocarbohidrazona) ao íon manganês(II).<sup>34</sup>

*Bis*(hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina (ver Figura 1.3) apresentam propriedades quelantes frente a vários íons metálicos e essa diversidade é aumentada pela possibilidade que apresentam de coordenar-se como ligantes neutros, desprotonados ou parcialmente desprotonados. Um estudo mostrou que 2,6-diacetilpiridina *bis*(semicarbazona) coordenou-se ao estanho(IV) na forma neutra, enquanto que 2,6-diacetilpiridina *bis*(2-tenoilhidrazona) e 2,6-diacetilpiridina *bis*(2-furanoilhidrazona) ligaram-se ao estanho(IV) nas formas desprotonada e parcialmente desprotonada, respectivamente. Esses compostos geralmente adotam geometria pentagonal bipiramidal quando coordenados a íons de metais de transição. No entanto, a natureza da coordenação depende também do íon metálico, do pH do meio reacional e também da natureza da hidrazona.<sup>39</sup>

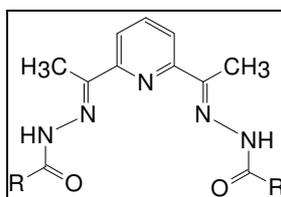


Figura 1.3 – Estrutura geral de *bis*(hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina.

Uma das estratégias utilizadas nessa parte do trabalho foi preparar complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de *bis*(fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina com o interesse em avaliar o perfil farmacológico dessa classe de compostos.

### 1.1.5 Complexos de clioquinol com platina(II,IV) e estanho(IV) como candidatos a fármacos antitumorais e antimicrobianos

O aumento de infecções sistêmicas causadas por fungos é decorrente do crescimento de indivíduos imunocomprometidos, que passam por tratamentos como os de transplantes, de câncer e, particularmente, de infecção por HIV (*human immunodeficiency vírus*). As principais infecções invasivas são causadas por espécies de fungos *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*, sendo que as espécies de *Candida* são os agentes patogênicos mais comuns<sup>40</sup>. Barreiras no tratamento dessas infecções aparecem, em parte, em razão do limitado número de agentes antifúngicos disponíveis na clínica e ao fato de que muitos desses são altamente tóxicos, pouco toleráveis e pouco eficazes. Além

<sup>38</sup> G.M. Rodriguez, I. Smith, Molec. Microbiol. 47 (2003) 1485.

<sup>39</sup> K.B. Gudasi, S.A. Patil, R.S. Vadavi, R.V. Shenoy, M. Nethajib, S.W.A. Bligh, Inorg. Chim. Acta. 359 (2006) 3229.

<sup>40</sup> B.E. Mansfiel, H.N. Oltean, B.G. Oliver, S.J. Hoot, S.E. Leyde, L. Hedstrom, T.C. White, PLoS Pathogens. 6 (2010) 1.

disso, o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos atuais, sendo o fluconazol o mais comum entre eles, dificulta a terapia.<sup>40,41</sup>

Portanto, grande é a necessidade no desenvolvimento de novas terapias que possam superar essas barreiras. Uma das técnicas que tem sido amplamente aplicada na clínica é a de combinações de antifúngicos, objeto de estudo deste trabalho. Essa técnica apresenta vantagens como o aumento da eficácia sobre o uso de fármacos individuais e conseqüentemente, o emprego de doses mais baixas, com a redução da toxicidade e uma melhor tolerância. A combinação pode levar a um espectro de eficácia mais amplo e a um maior potencial de prevenção a organismos resistentes decorrentes da monoterapia.<sup>42</sup>

Em muitos casos, a coordenação ao metal provoca um aumento no potencial de ação farmacológica dos compostos<sup>43</sup>. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que a coordenação de compostos orgânicos bioativos com estanho(IV) leva a um aumento da atividade antibacteriana e antifúngica.<sup>19,44,45,46</sup>

Desse modo, a obtenção de complexos de estanho(IV) com o clioquinol poderia resultar em novos compostos antimicrobianos. A figura seguinte apresenta a estrutura do clioquinol.

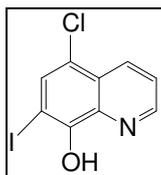


Figura 1.4 – Estrutura de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol).

Diante do potencial do clioquinol em formar complexos metálicos e de suas propriedades citotóxicas, o preparo de novos complexos metálicos com o clioquinol como ligante, bem como a avaliação da ação citotóxica desses compostos, como proposto no presente trabalho, torna-se muito interessante. Complexos de platina(II) e de platina(IV) são bem conhecidos por suas propriedades antitumorais, podendo agir como análogos da cisplatina. Pareceu-nos então interessante obter e testar complexos de platina(II,IV) com clioquinol em células tumorais humanas.

Pretendeu-se, no presente trabalho, explorar a capacidade quelante de compostos orgânicos no planejamento de novos candidatos a protótipos de fármacos antimicrobianos, antitumorais e para uso em doenças neurodegenerativas.

<sup>41</sup> B. Zhai, H. Zhou, L. Yang, J. Zhang, K. Jung, Chou-Zen Giam, X. Xiang, X. Lin, J. Antimicrob. Chemother. 65 (2010) 931.

<sup>42</sup> M.R. Harris, P.J. Coote, Int. J. Antimicrob. Ag. 35 (2010) 347.

<sup>43</sup> S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 235.

<sup>44</sup> I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. Santos, P.R.O. Silva, I. Garcia, A. Castineiras, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 1454.

<sup>45</sup> G.L. Parrilha, J.G. da Silva, L.F. Gouveia, A.K. Gasparoto, R.P. Dias, W.R. Rocha, D.A. Santos, N.L. Speziali, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 1473.

<sup>46</sup> I.C. Mendes, F.B. Costa, G.M. Lima, J.D. Ardisson, I. Garcia-Santos, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 1179.

## 1.2 Objetivos

O presente trabalho consistiu há investigação do perfil farmacológico de compostos com aplicações como agentes antineoplásicos, antimicrobianos e contra doenças neurodegenerativas.

Foram preparadas duas classes de ligantes orgânicos: a primeira constituída por agentes quelantes para a remoção de metais tóxicos e a segunda por ligantes potencialmente bioativos para a formação de complexos com aplicações como agentes antitumorais e antimicrobianos.

A família de ligantes escolhida para o estudo de novos agentes quelantes para a remoção de metais tóxicos foi a de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona com diferentes substituintes no grupo fenila ligado ao nitrogênio terminal *N*(3). Uma vez que a presença de excesso de íons zinco(II) pareceria estar associada a doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer, estudamos os complexos de zinco(II) desses ligantes.

Os ligantes potencialmente bioativos escolhidos para a formação de complexos com aplicações como agentes antitumorais e antimicrobianos foram: tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil, 2-acetil e 2-benzoilpiridina *N*(4)-toluil substituídas, 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazona) e seus derivados 2,6-diacetilpiridina *bis*(*para*-clorofenilhidrazona) e 2,6-diacetilpiridina *bis*(*para*-nitrofenilhidrazona). Estudamos igualmente o fármaco em uso clínico 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol) e seus complexos metálicos. Foram estudados complexos de platina(II,IV), ouro(I,III), bismuto(III), antimônio(III) e estanho(IV).

O trabalho consistiu das seguintes etapas:

- Síntese e caracterização dos ligantes orgânicos;
- Síntese e caracterização dos complexos de zinco(II) com tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona, dos complexos de ouro(I, III) e platina(II, IV) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil, 2-acetil e 2-benzoilpiridina *N*(4)-toluil substituídas, dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) com as *bis*(fenilhidrazonas) e, por último, dos complexos de platina(II, IV) e de estanho(IV) com o clioquinol;
- Investigação do perfil farmacológico desses compostos frente a diferentes sistemas biológicos, de acordo com a atividade biológica de interesse: bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas, fungos, linhagens de células de tumores sólidos e leucemias;
- Avaliação dos mecanismos de ação citotóxica pelos estudos de inibição da enzima Tiorredoxina Redutase, de interação com o ADN plasmidial e de indução de vias pró-apoptóticas nas linhagens de células estudadas.

## ***Parte Experimental***

### *2.1 Equipamentos e procedimentos*

#### *2.1.1 Determinação de temperaturas de fusão*

- Equipamento Mettler FP 90.

#### *2.1.2 Pesagens*

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica Mettler AE 163, precisão 0,0001g e em uma balança Gehaka, modelo AG 200, precisão 0,001g.

#### *2.1.3 Análise Elementar*

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

#### *2.1.4 Análises Térmicas*

As curvas termogravimétricas foram obtidas na Termobalança Shimadzu-TGA50H do Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de N<sub>2</sub>, com razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 750 °C.

#### *2.1.5 Espectroscopia Mössbauer de <sup>119</sup>Sn*

Os espectros foram obtidos através de um espectrômetro Mössbauer convencional, utilizando-se uma fonte de <sup>119</sup>Sn contida em uma matriz radioativa de CaSnO<sub>3</sub> em aceleração constante, mantida a temperatura ambiente e geometria de transmissão. As medidas foram feitas a 80K, sem aplicação de campo magnético externo. Os espectros foram ajustados usando um programa numérico desenvolvido pelo R. A. Brand, conhecido como "NORMOS". As análises foram realizadas no Centro de Desenvolvimento em Tecnologia Nuclear – CDTN – em Minas Gerais, pelo Dr. José Domingos Ardisson.

#### *2.1.6 Espectroscopia no Infravermelho*

Os espectros no infravermelho foram registrados nas regiões entre 4000-400 cm<sup>-1</sup> e 710-200 cm<sup>-1</sup> utilizando um espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX e pastilhas de KBr ou emulsões de nujol em janelas de CsI.

#### *2.1.7 Espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite*

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

### 2.1.8 Análises Condutimétricas

O equipamento utilizado nas medidas de condutividade molar foi um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante 0,088 cm<sup>-1</sup>. As medidas foram feitas a partir de soluções de concentração 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> dos compostos, utilizando-se dimetilformamida (DMF) como solvente. Os resultados foram analisados conforme a atribuição sugerida por Geary<sup>1</sup>, a qual é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1- Atribuição do tipo de eletrólito<sup>1</sup> para soluções de concentração 1,0.10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>

Solvente	$\Lambda_M$ (cm <sup>2</sup> Ω <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	Tipo de eletrólito
	65-90	1:1
DMF	130-170	2:1
	200-240	3:1

### 2.1.9 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados nos espectrômetros Bruker DRX-400 AVANCE (400 MHz) e Bruker AVANCE DPX-200 (200 MHz) localizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Departamento de Química da UFMG. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> ou MeOD-*d*<sub>4</sub> como solvente e TMS como referência interna em tubos de 5 mm de diâmetro externo.

### 2.1.10 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível

Os espectros de UV-Vis foram obtidos por meio de um espectrofotômetro HP8453 *diode array* – Hewlett Packard, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico, em soluções de DMF de concentração da ordem de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### 2.1.11 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos a partir do espectrômetro de massas com ionização *electrospray* e analisador *ion trap* (LCQ Fleet, Thermo-Scientific, San Jose, CA) e do espectrômetro de massas acoplado a HPLC (LCMS-IT-TOF, Shimadzu).

### 2.1.12 Cristalografia por Difração de Raios X

As estruturas cristalográficas foram determinadas em colaboração com professor Dr. Nivaldo Speziali (Departamento de Física, UFMG), a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Isolda Maria de Castro Mendes, da Escola de Belas Artes da UFMG, o Prof. Dr. Bernardo Lages Rodrigues, do Departamento de Química da UFMG, e o aluno de doutorado Jeferson Gomes da Silva, com supervisão do Prof. Dr. Nivaldo Speziali. Os detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritos nos capítulos.

Os dados cristalográficos dos diferentes compostos foram coletados no difratômetro Oxford GEMINI no modo  $\theta$ - $2\theta$ .

<sup>1</sup> J.W. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

## 2.2 Reagentes e solventes

Todos os reagentes usados foram de alto grau de pureza. As procedências dos reagentes foram as seguintes: tiossemicarbazidas (Merck e Aldrich),  $N_2H_4H_2O$  (Aldrich), *m*-cloroisotiocianato, *m*-flúorisotiocianato, *m*-iodoisotiocianato, *m*-nitroisotiocianato e *o*-, *m*-, *p*-toluilisotiocianato (Aldrich), acetato de sódio (Synth), acetofenona (Sigma-Aldrich), benzofenona (Sigma-Aldrich), 2,6-diacetilpiridina (Aldrich), benzoilhidrazida (Aldrich), 4-clorobenzoilhidrazida (Fluka), 4-nitrobenzoilhidrazida (Aldrich), 7-cloro-5-iodo-8-hidroxiquinolina (Fluka), cloreto de antimônio(III) (Aldrich), cloreto de bismuto(III) (Aldrich), cloreto de zinco(II) (Merck), tetracloroaurato(III) de hidrogênio (Aldrich), tetracloropaladato(II) de potássio (Strem Chemicals e Sigma), tetracloroplatinato(II) de potássio (Strem Chemicals), hexacloroplatinato(II) de potássio (Strem Chemicals), metanol (Synth), etanol (Synth), éter etílico (Grupo Química), acetona (Quimex), DMF (Synth), DMSO (Synth).

## 2.3 Meios de cultura

Foram utilizados os meios Mueller Hinton para bactérias, e Sabouraud e (Roswell Park Memorial Institute) RPMI 1640 para fungos. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) enriquecido com 10% de soro fetal bovino foi utilizado em testes de atividade citotóxica. Meio Schneider suplementado com 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de L-glutamina, 10 % de soro fetal bovino e 2 % de urina humana foram utilizados no teste de atividade contra Leishmania.

## 2.4 Síntese dos ligantes e complexos

As tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona *N*(3)-substituídas com grupos toluil em posição *orto*, *meta* e *para* ou com substituintes *meta*-clorofenil, *meta*-flúorfenil, *meta*-iodofenil e *meta*-nitrofenil foram obtidas por procedimento análogo ao descrito na literatura para alquilamina tiossemicarbazonas.<sup>2</sup>

As tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina, 2-benzoilpiridina *N*(4)-substituídas com grupos toluil em posição *orto*, *meta* e *para*, foram obtidas por procedimento análogo ao descrito na literatura para *N*(4)-fenil tiossemicarbazonas.<sup>3</sup>

2,6-diacetilpiridina-*bis*(fenilhidrazona) ( $H_2AcPh$ ) e seus derivados *bis*(*para*-clorofenil) ( $H_2AcPClPh$ ) e *bis*(*para*-nitrofenil) ( $H_2AcPNO_2Ph$ ) foram preparados conforme descrito.<sup>4,5</sup>

<sup>2</sup> T. Siatra-Papastakoudil, A Tsotinis, C.P. Raptopoulou, C. Sambani, H. Thomou, Eur. J. Med. Chem. 30 (1995) 107.

<sup>3</sup> D.X. West, N.M. Kozub, G.A. Bain, Transition Met. Chem. 21 (1996) 52.

<sup>4</sup> M Carcelli, P Mazza, C Pelizzi, G Pelizzi, F Zani, J. Inorg. Biochem. 57 (1995) 43.

<sup>5</sup> M.T. Benson, T.R. Cundari, L.C. Saunders, S.O. Sommerer, Inorg. Chim. Acta. 258 (1997) 127.

2.4.1 Síntese de acetofenona- e benzofenona- *N*(3)-orto *N*(3)-meta, *N*(3)-para-toluil tiossemicarbazonas (HAc3oT, HAc3mT e HAc3pT, HBz3oT, HBz3mT e HBz3pT) e acetofenona e benzofenona *N*(3)-meta-clorofenil, *N*(3)-meta-flúorfenil, e *N*(3)-meta-nitrofenil tiossemicarbazonas (HAc3mCl, HAc3mF, HBz3mNO<sub>2</sub>, HBz3mCl, HBz3mF e HBz3mNO<sub>2</sub>)

As tiossemicarbazonas HAc3oT, HAc3mT, HAc3pT e HBz3pT já foram caracterizadas anteriormente por outros grupos<sup>6,7</sup>. A reação de síntese ocorre em duas etapas: Uma solução de hidrazina (10 mmol) em metanol (10 mL) foi adicionada à solução de isotiocianato (10 mmol em 10 mL de metanol) desejado, mantendo-se a reação sob agitação em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, deixou-se a reação em agitação por 24 horas à temperatura ambiente. O sólido branco formado foi lavado com éter etílico. Na segunda etapa, uma solução de acetofenona ou benzofenona (5 mmol) em metanol (10 mL) com 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi deixada sob agitação por 15 minutos. Em seguida adicionou-se a solução metanólica da tiossemicarbazida desejada (10 mmol) e deixou-se a reação em agitação magnética por mais 24h à temperatura ambiente (ver esquema de síntese à Figura 2.1). O sólido formado foi lavado com metanol e éter etílico e secado sob vácuo (ver Tabela 3.1.1).

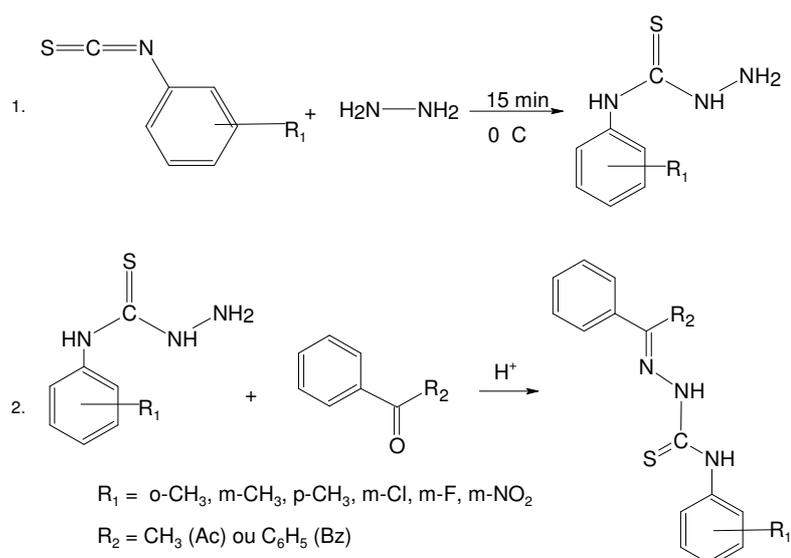


Figura 2.1 - Esquema de síntese de HAc3oT, HAc3mT, HAc3pT, HBz3oT, HBz3mT, HBz3pT, HAc3mCl, HAc3mF, HBz3mNO<sub>2</sub>, HBz3mCl, HBz3mF e HBz3mNO<sub>2</sub>.

2.4.2 Síntese dos complexos de zinco(II) de acetofenona- e benzofenona- *N*(3)-meta- clorofenil, *N*(3)-meta-flúorfenil, *N*(3)-meta-nitrofenil e *N*(3)-meta-toluil tiossemicarbazonas

A tiossemicarbazona desejada foi previamente solubilizada em metanol, adicionando-se etilenodiamina na mesma proporção. Em seguida, adicionou-se uma solução aquosa de ZnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O na relação molar de 1:1 ligante-metal. A reação foi deixada sob refluxo por aproximadamente 10 h. Os

<sup>6</sup> T. V Saraswathi, V. Ranga, V. R Srinivasan, M. Ramaiah, Ind. J. Chem. 10 (1972) 1151.

<sup>7</sup> V.K. Panchal, U.R. Dhruv, P.B. Patel, J. Instit. Chem. (India) 67 (1995) 86.

sólidos foram lavados com metanol e água a quente e, em seguida, secados a vácuo (vide esquema de síntese na Figura 2.2 e a Tabela 4.1.1).

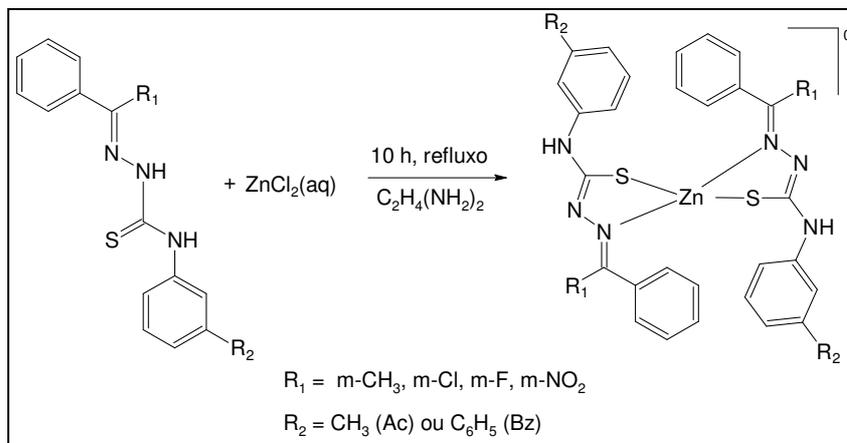


Figura 2.2 - Esquema de síntese dos complexos de zinco(II) de *N*(3)-*m*-clorofenil, *N*(3)-*m*-flúorfenil, *N*(3)-*m*-nitrofenil e *N*(3)-*m*-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetofenona e 2-benzofenona.

#### 2.4.3 Síntese dos complexos de ouro(I,III), platina(II) e platina(IV) de 2-formilpiridina-, 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina- *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para toluil tiossemicarbazonas

Os complexos de ouro foram obtidos pela adição da tiossemicarbazona (1 mmol) desejada (no sólido, aos poucos) à solução de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (1,1 mmol) em metanol (5 mL), deixando-se a reação sob aquecimento por cerca de 1h. Os produtos sólidos resultantes foram filtrados, lavados com metanol a quente e secados a vácuo (vide esquema de síntese na Figura 2.3 e a Tabela 5.1.1).

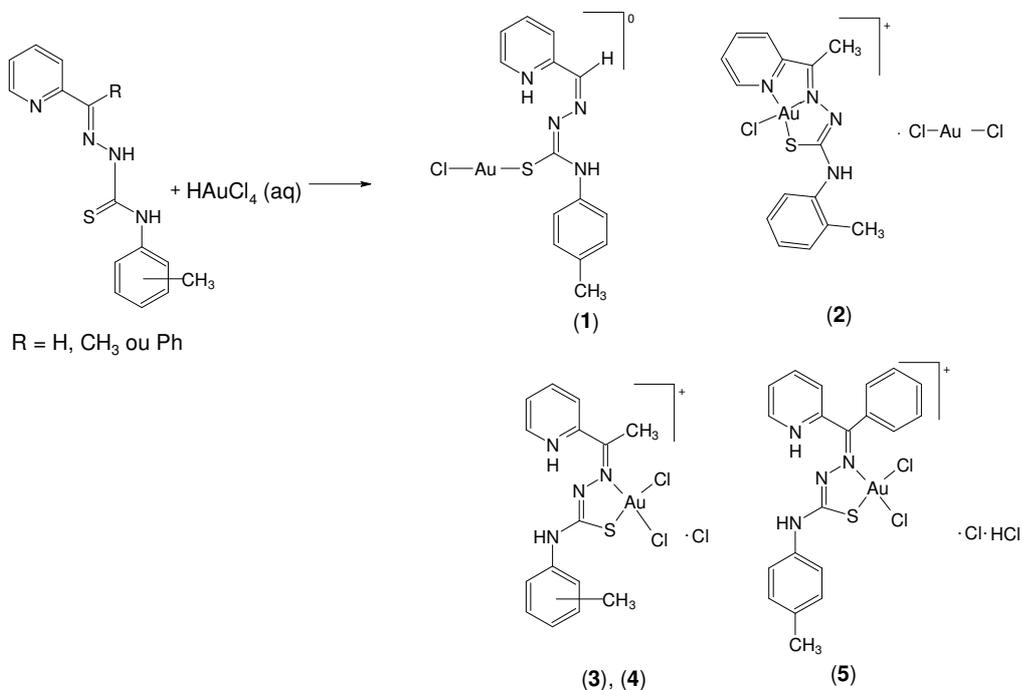


Figura 2.3 - Esquema de síntese do complexo de ouro(I) de 2-formilpiridina- *N*(4)-*p*-toluil tiossemicarbazona e dos complexos de ouro de 2-acetilpiridina-*N*(4)-*o*-, *N*(4)-*m*- e *N*(4)-*p*-toluil tiossemicarbazonas e 2-benzoilpiridina-*N*(4)-*p*-toluil tiossemicarbazona.

Os complexos de platina(II) foram preparados pela mistura de uma solução etanólica (10 mL) da tiossemicarbazona (1 mmol) desejada com uma solução aquosa (5 mL) do sal  $K_2PtCl_4$  (1 mmol). A reação foi deixada sob refluxo por cerca de 4 h. Os sólidos foram filtrados, lavados com etanol e água a quente e secados a vácuo (vide esquema de síntese à Figura 2.4 e a Tabela 5.2.1).

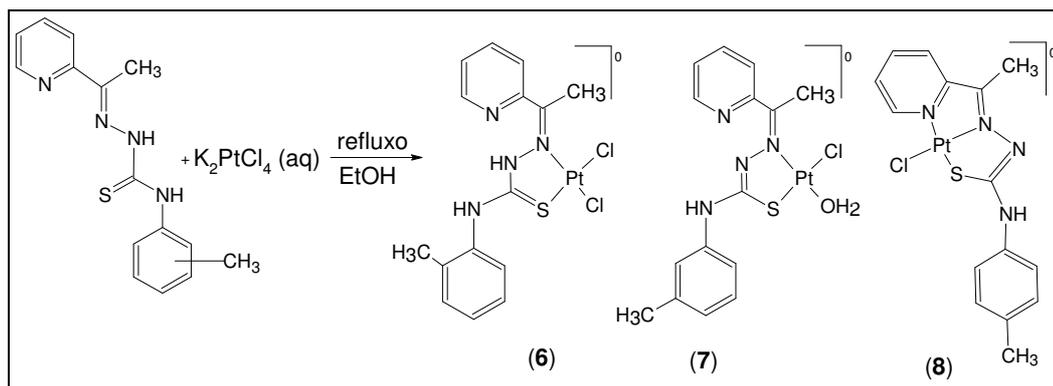


Figura 2.4 - Esquema de síntese dos complexos de platina(II) de 2-acetilpiridina *N*(4)-*o*-toluil, *m*-toluil e *p*-toluil tiossemicarbazonas.

Os complexos de platina(IV) foram preparados pela mistura de uma solução etanólica (10 mL) da tiossemicarbazona (1 mmol) desejada com uma solução aquosa (5 mL) do sal  $K_2PtCl_6$  (1 mmol). A reação foi realizada à temperatura ambiente. A mistura reacional foi deixada sob agitação por aproximadamente sete dias. Os sólidos foram filtrados, lavados com etanol e água destilada, e secados a vácuo (vide esquema de síntese na Figura 2.5 e Tabela 5.2.1).

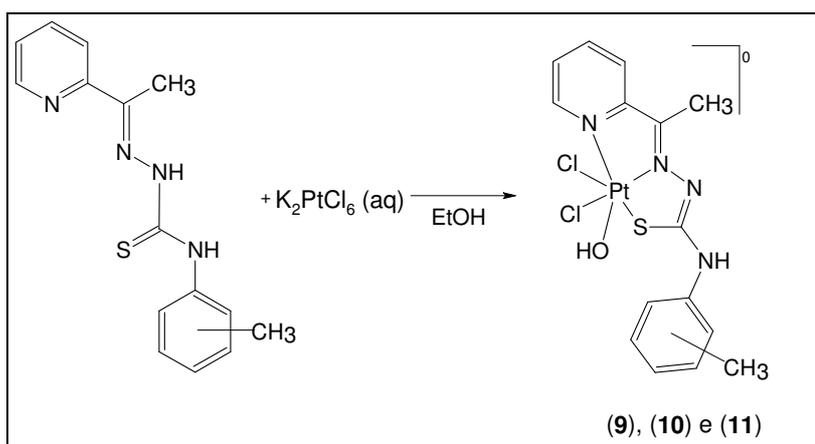


Figura 2.5 - Esquema de síntese dos complexos de platina(IV) de 2-acetilpiridina *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil tiossemicarbazonas.

2.4.4 Síntese de 2,6-diacetilpiridina bis(fenilhidrazona) ( $H_2AcPh$ ) e seus derivados bis(para-clorofenilhidrazona) ( $H_2AcpClPh$ ) e bis(para-nitrofenilhidrazona) ( $H_2AcpNO_2Ph$ )

As bis(fenilhidrazonas) foram preparadas conforme método descrito na literatura<sup>3</sup>: Em 30 mL de metanol seco adicionou-se 10 mmol de 2,6-diacetilpiridina e gotas de ácido acético sob agitação. Após a dissolução, acrescentou-se 20 mmol da hidrazida desejada e a reação foi deixada sob refluxo e agitação por 4h. Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com metanol e secados sob vácuo.

2.4.5 Síntese dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina-bis(fenilhidrazona) ( $H_2AcPh$ ) e seus derivados bis(para-clorofenilhidrazona) ( $H_2AcpClPh$ ) e bis(para-nitrofenilhidrazona) ( $H_2AcpNO_2Ph$ )

Os complexos de bismuto(III) e antimônio(III) foram obtidos a partir da reação entre 1 mmol da bis(fenilhidrazona) desejada e 1 mmol de  $MCl_3$  ( $M = Bi, Sb$ ) em metanol. O ligante foi previamente solubilizado sob aquecimento e o sal foi adicionado aos poucos, no estado sólido. A mistura resultante foi deixada em refluxo por 4h. Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com metanol a quente e secados sob vácuo (vide esquema de síntese na Figura 2.6 e a Tabela 6.1.1).

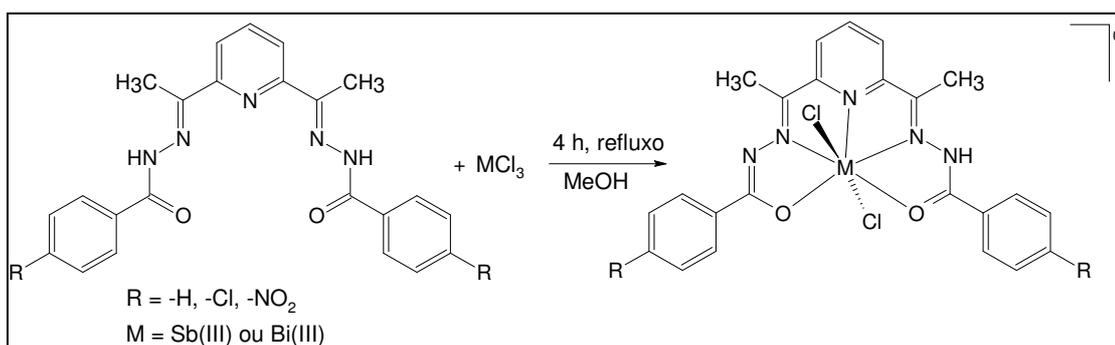


Figura 2.6 - Esquema de síntese dos complexos de antimônio(III) e bismuto(III) de bis(fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina.

2.4.6 Síntese dos complexos organoestânicos e de platina(II,IV) de clioquinol

Em 20 mL de etanol foi adicionado cerca de 1 mmol de clioquinol e a mistura foi deixada sob agitação e aquecimento para solubilização. Em seguida, foi adicionada uma solução aquosa de  $K_2PtCl_4$  ou  $K_2PtCl_6$  (1 mmol). A reação foi feita sob refluxo por cerca de 4 horas para a obtenção do complexo de platina(II). Para o complexo de platina(IV) a reação foi feita à temperatura ambiente e a mistura reacional permaneceu sob agitação durante uma semana (vide esquema de síntese na Figura 2.7 e Tabela 7.1.1).

Para obtenção dos complexos organoestânicos foram utilizados os sais  $(n-Bu)SnCl_3$  e  $SnPhCl_3$ . O sal de partida desejado foi adicionado diretamente à solução etanólica de clioquinol. A reação foi deixada sob refluxo por aproximadamente 3 horas e em seguida o precipitado foi lavado com água e etanol e filtrado a vácuo (vide esquema de síntese na Figura 2.7 e Tabela 7.2.1).

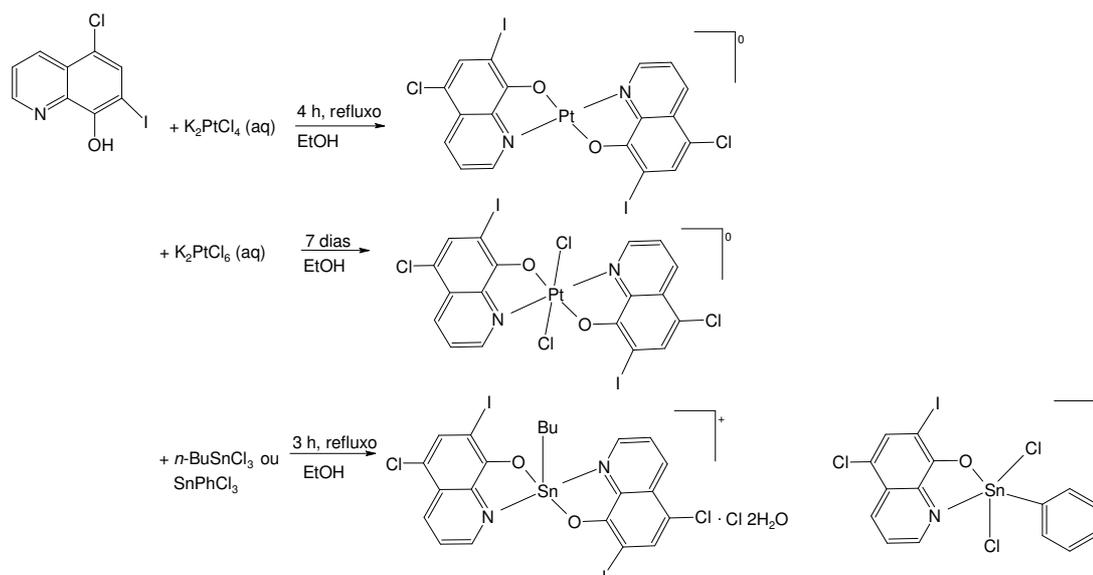


Figura 2.7 - Esquema de síntese dos complexos organoestânicos e de platina(II, IV) de clioquinol.

## 2.5 Atividade Biológica

### 2.5.1.1 Atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados quantitativamente pelo método de macrodiluição em série<sup>8</sup>. Os testes de inibição de crescimento foram realizados seguindo os padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)<sup>9,10</sup>. Cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram inoculadas em caldo Muller Hinton e as cepas do fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) inoculadas em caldo Sabouraud, sendo ambas incubadas a 37° C por 18 a 24 h.

A referência para a turbidez do inóculo foi medida pela análise do seu espectro de absorção na região ultravioleta, nos comprimentos de onda 530 nm e 625 nm, devendo fornecer um valor entre 0,08 e 0,1 de forma que a concentração do inóculo foi de  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC). Foram retirados 100  $\mu$ L do inóculo e transferidos para outro tubo contendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton Broth, de modo que a concentração de inóculo neste tubo foi de  $10^6$  UFC. Foram acrescentados 200  $\mu$ L deste inóculo aos tubos de diluição contendo 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> das substâncias testadas, de modo que a concentração de inóculo em cada tubo foi de  $10^5$  UFC. Como controle positivo usou-se a bactéria/ou o fungo no meio de cultura; no controle

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

<sup>9</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards, Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, in: NCCLS Document M7-A6, Pennsylvania, USA, 2003, ISBN: 1-56238-486-4.

<sup>10</sup> 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).

negativo usou-se a bactéria/ou o fungo, o meio de cultura e o antibiótico fluconazol para *C. albicans* e tetraciclina para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Após 20 horas de incubação em estufa a 37 °C foram feitas as análises da inibição e determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos compostos.

### 2.5.1.2 Atividade antifúngica utilizando o método de microdiluição

O estudo da atividade antifúngica dos complexos organoestênicos de clioquinol foram feitos em colaboração professor Dr. Daniel A. Santos (Departamento de Microbiologia, UFMG). As condições experimentais estão descritas a seguir.

Foram incluídas neste estudo doze amostras de *C. albicans*, uma amostra de *Candida krusei* (ATCC 200298), uma amostra de *Candida glabrata* (ATCC 90030) e uma amostra de *Candida parapsilosis* (ATCC 20019). Todas as amostras foram mantidas em Agar Sabouraud Dextrose a 4 °C. Antes do teste, as leveduras foram transferidas para um novo tubo contendo o mesmo meio de cultura e incubadas a 37 °C por 24 h. As suspensões dos fungos foram preparadas em solução salina estéril (0,85 %) e a transmitância foi ajustada para 85 % a 530 nm no espectrômetro. A suspensão resultante ( $1,0-5,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi agitada por 15 s e a densidade celular foi ajustada para  $1,0-5,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> em meio RPMI 1640.

#### Concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de microdiluição<sup>11</sup> foi realizado em meio RPMI 1640 (Inlab, Brasil) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165 M (Sigma). O pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi esterilizado por membrana de filtração à vácuo com porosidade de 0,22 µm. 10,0 mg da substância foram solubilizadas em DMSO, seguido de diluição dupla em série em meio RPMI 1640, a fim de obter concentrações entre 128 a 0,25 mg L<sup>-1</sup>. Aliquotas de 100 µL da substância em diferentes concentrações foram distribuídas em placas de 96 poços e, em seguida, adicionou-se 100 µL da suspensão do inóculo. Os controles também foram feitos para esterilidade e crescimento. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. todas as concentrações foram testadas em duplicata.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida visualmente como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento de fungos em comparação com o crescimento do controle. Para o fluconazol (controle positivo), a CIM foi a menor concentração que inibiu 80% do crescimento de fungos.

#### Testes de interação

Nos testes de interação os compostos estudados foram combinados com o fluconazol em doze isolados de *C. albicans*. O meio de cultura e as preparações do inóculo foram os mesmos descritos para a determinação da CIM. O método utilizado foi o de microdiluição em xadrez<sup>11</sup>, que estabelece uma matriz de todas as combinações possíveis de todas as concentrações na faixa em que foram

---

<sup>11</sup> D.A. Santos, M.E.S. Barros, J.S. Hamdan, J. Clin. Microbiol. 44 (2006) 98.

usadas no teste de susceptibilidade de *C. albicans*. Uma microplaca foi usada para testar cada cepa, para cada par de combinações das substâncias. A determinação do ponto final foi obtida visualmente como a concentração mais baixa que mostra a inibição do crescimento para cada par de concentrações das substâncias. Os modos de interação entre os compostos estudados com o fluconazol foram classificados como aditivo, sinérgico, indiferente ou antagonista, com base no perfil das curvas de interação medicamentosa e por meio do índice de concentração inibitória fracionada (CIF) que foi calculado da seguinte forma: (CIM A em combinação / CIM A) + (CIM B em combinação / CIM B). A interação foi definida como sinérgica para valores de CIF  $\leq 0,5$ , aditiva quando CIF  $> 0,5 \leq 1,0$ , indiferente quando CIF  $> 1,0 \leq 4,0$  e antagonista quando CIF  $> 4,0$ <sup>12</sup>. Todos os testes foram realizados em duplicata.

### 2.5.2 Atividade contra leishmaniose

#### Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-35 g) machos, adultos jovens, com 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério Central da UFAL. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 h). Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas com normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFAL (Protocolo nº 23065.024392/2009-90). Após a utilização nos experimentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

#### Parasitas

A cepa PH8 de *Leishmania (L.) amazonensis* foi utilizada em todas as experiências. Os parasitos foram mantidos *in vitro* como formas promastigotas em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco-Life), 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Life) e 2% de urina humana.

#### Ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* numa concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL num volume de 200  $\mu$ L foram cultivadas em triplicatas em placa de 96 poços (TPP ref. 92696) com meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana. Os compostos a serem testados foram adicionadas aos poços contendo as promastigotas a uma concentração de 100  $\mu$ M/poço e a placa foi incubada em estufa BOD a 27 °C por 48 h. Após esse período, o número de parasitos foi determinado pelo método enzimático MTT<sup>13</sup>. 10  $\mu$ L de MTT (10 mg/ mL) foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por mais 4h. A reação enzimática foi parada

<sup>12</sup> A. Gómez-López, G. Garcia-Effron, E. Mellado, A. Monzon, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, Antimicrob. Agents Chemother. 47 (2003) 3085.

<sup>13</sup> T. Mosmann, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55.

pela adição de 100 µL de solução 50% isopropanol–10% dodecil sulfato de sódio. A densidade óptica a 570 nm foi medida usando um leitor de ELISA (BioSource, Inc., EUA). Três experimentos independentes foram feitos, em triplicatas, para determinação da citotoxicidade dos compostos. Os dados foram analisados usando MiniTab®.<sup>14</sup>

Para avaliar a toxicidade dos compostos selecionados foi feito um ensaio *in vitro* de citotoxicidade em promastigotas *Leishmania (L.) amazonensis*. A porcentagem de inibição do crescimento dos parasitos foi determinada utilizando o método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio (MTT). O MTT é um sal de coloração amarela, que é reduzido por desidrogenases mitocontriiais de células vivas apenas, formando um produto de coloração roxa, insolúvel em água (formazan).

Resumidamente, as leishmanias foram distribuídas em placas de 96 poços (TPP ref. 92696) na concentração de  $1 \times 10^7$  promastigotas/mL. Após 24h de crescimento da cultura, os compostos estudados foram adicionados na concentração de 100 µM/poço. Após 48h de incubação, 10 µL de MTT (10 mg/ mL) foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por mais 4h. A reação enzimática foi parada pela adição de 100 µL de solução 50% isopropanol–10% dodecil sulfato de sódio. A densidade óptica a 570 nm foi medida usando um leitor de ELISA (BioSource, Inc., EUA). Três experimentos independentes foram feitos, em triplicatas, para determinação da citotoxicidade dos compostos. Os dados foram analisados usando MiniTab®.

### 2.5.3 Atividade Citotóxica

Os testes de atividade citotóxica foram realizados no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, em colaboração com a Dra. Raquel G. dos Santos, onde foram usadas células de glioblastomas humanos U87 (p53 selvagem) e T98 (p53 mutante); e no Departamento de Fisiologia da UFMG, em colaboração com a Prof. Dra. Elaine M. Souza-Fagundes, onde foram empregadas linhagens de células tumorais MCF-7 originadas de um adenocarcinoma de mama humano, HL-60 e Jurkat, de leucemia humana, e HCT-116 de carcinoma colorretal humano.

#### *Atividade citotóxica – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear*

##### *Linhagens de células e condições de cultura*

---

<sup>14</sup> J.L. Ávila, A. Ávila, M.A. Polegre, V.E. Márquez, Am. J. Trop. Med. Hyg. 57 (1997) 407.

Células tumorais de glioblastoma T-98 e U-87 foram mantidas no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enriquecido com 10% de SFB (Cultilab) e antibióticos (50 U mL<sup>-1</sup> de penicilina/50 µmol L<sup>-1</sup> de estreptomicina), sob atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % ar a 37 °C por 24 h.

### *Atividade Citotóxica*

Para determinar os valores de CI<sub>50</sub> (concentração inibitória da proliferação de 50 % de células), os efeitos citotóxicos foram quantificados através do ensaio MTT<sup>13</sup>. As células foram sedimentadas em placas de 96 poços, na densidade celular de 1x10<sup>3</sup> – 2x10<sup>3</sup> células/poço e tratadas com diferentes concentrações (1x10<sup>-12</sup> mol L<sup>-1</sup> – 1x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) dos compostos previamente dissolvidos em DMSO, de modo que a concentração desse solvente no meio DMEM fosse menor que 0,50%. Foram utilizadas cisplatina ou auranofina como controles positivos 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.

### *Análise morfológica das células tumorais*

As células de todas as linhagens foram tratadas com os compostos (1 µmol L<sup>-1</sup>) e mudanças morfológicas foram analisadas após 48 h de incubação por microscópio contraste de fase (Nikon).

### *Atividade citotóxica – Departamento de Fisiologia da UFMG*

#### *Preparo das soluções estoque*

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

#### *Preparo das soluções de uso*

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

#### *Controles positivos*

Selecionou-se a cisplatina como controle positivo, a qual já possui seu mecanismo de ação bem caracterizado na literatura<sup>15</sup> e é utilizada na terapia do câncer.

#### *Avaliação da atividade citotóxica*

Após a contagem de células, a suspensão foi preparada de forma que 100 µL dessa suspensão contivessem 40.000 células (densidade de inóculo). Cada poço foi preenchido com 100 µL

---

<sup>15</sup> E.R. Janieson, S.J. Lippard, Chem. Rev. 99 (1999) 2467.

da suspensão de células, 20 µL de amostra (concentração em cada poço = 50 µM) ou do controle positivo e 80 µL de meio de cultura DMEM, utilizado para células MCF-7, HL-60, Jurkat e HCT-116, enriquecido com 5% de SFB e penicilina, estreptomicina e anfotericina (volume final do poço = 200 µL) ou o meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institut). Nos poços destinados ao controle de células, foram aplicados 100 µL da suspensão de células e 100 µL de meio DMEM ou RPMI-1640 enriquecido com 5% de SFB e penicilina, estreptomicina e anfotericina. As amostras foram plaqueadas no poço após aproximadamente 24 h de prévia incubação das células (estabilização). A avaliação da proliferação celular foi realizada após 48 h de tratamento das células com as amostras, pelo método MTT. Os testes foram feitos em triplicata. Cada triplicata, considerada um experimento independente, foi repetida no mínimo três vezes.

### *Avaliação da atividade citotóxica em células de sangue periférico*

Células mononucleares de sangue periférico humano (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) foram separadas conforme o método descrito por Gazzinelli e colaboradores<sup>16</sup>. O sangue heparinizado foi aplicado em tubos 15 mL, 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 min, 1400 rpm a 18 °C. Após a centrifugação, as células foram removidas com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL, estéril. Em seguida, as células foram lavadas e a densidade celular ajustada para  $2,0 \times 10^6$  células/mL. 100 µL desta suspensão (250.000 células) foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) 1 mg/mL e incubadas por 24 h em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 100% de umidade a 37 °C para estabilização. Em seguida os compostos a serem testados foram adicionados e incubados por 72 h em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 100% de umidade a 37 °C.

As células foram mantidas em meio de cultivo completo (CMBLAST) contendo RPMI (Sigma), suplementado de 5% de soro humano normal AB Rh+, previamente inativado, 3% de L-Glutamina (solução estoque 200 mM), 2% da mistura de antibiótico-antimicótico (solução estoque 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina). Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se como controle positivo a cisplatina, usando um controle do solvente (DMSO) na maior concentração das amostras. A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de MTT, já descrito anteriormente.

### *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,

---

<sup>16</sup> G. Gazzinelli, N. Katz, R.S. Rocha, D.G. Colley, J. Immunol. 130 (1983) 2891.

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 colaboradores<sup>17</sup>. 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 µg mL<sup>-1</sup> 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 rompimento da mesma. O material nuclear se torna acessível ao PI, que irá se intercalar no ADN nuclear. O conteúdo de ADN subdiploide foi determinado pelo programa CellQuest (Becton Dickinson).

### 2.5.4 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, 136 ng de ADN plasmidial pGEM®-T purificado (Promega-USA) foram incubados com os compostos (200 µmol L<sup>-1</sup>) em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,2) a 37 °C por 24 h. Em seguida, foi adicionada solução de leitura (50 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl, pH 7,2, 0,01 % de bromofenol azul, 50 % de glicerol e 250 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de 1% de agarose imersa em tampão TBE (0,5X) por 1 h e 30 min. a 75 mV. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução 2,5 µg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio em tampão TBE 0,5X por 15 min e o ADN foi visualizado por fluorescência em 312 nm.

### 2.5.5 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 colaboradores<sup>18</sup>. Alíquotas de 20 µL de solução diluída de TrxR em tampão fosfato de potássio 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 (contendo aproximadamente 0,10 unidades da enzima) foram

<sup>17</sup> I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, J. Immunol. Meth. 139 (1991) 271.

<sup>18</sup> 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.

incubadas por 1 h a 37 °C com 20 µL das soluções dos compostos (10 µM) ou com DMF 2,5% (controle negativo). 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<sup>-1</sup> pH 7,0, 0,2 mL de EDTA 500 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5, 0,80 mL de DTNB 63 mol L<sup>-1</sup> em etanol, 0,10 mL de albumina de soro bovino 20 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida 48 mmol L<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>, 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 e 4 min ( $\Delta$  Abs) de leitura. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 2.5.6 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

Para a avaliação da toxicidade aguda *in vivo* da tiossemicarbazona HAc3mT (BAMT) foi utilizado o método de classes descrito nas diretrizes da OECD (Protocolo 423)<sup>19</sup>.

#### Métodos

As ratas foram subdivididas aleatoriamente em três grupos de seis animais cada e submetidas a jejum de 8 h. Após esse período, as massas dos animais foram determinadas e foi administrada nos grupos testes uma dose inicial de 300 mg/kg por gavagem (*per os* – administração oral) e solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5 % p/V (CMC 0,5 %) em mesmo volume e via da solução teste para as ratas que pertenciam ao grupo controle. O mesmo teste foi realizado utilizando a dose de 2000 mg kg<sup>-1</sup> e óleo de milho como veículo.

O fluxograma do experimento encontra-se a seguir.

---

<sup>19</sup> OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. Paris: Head of Publications Service, 2001.

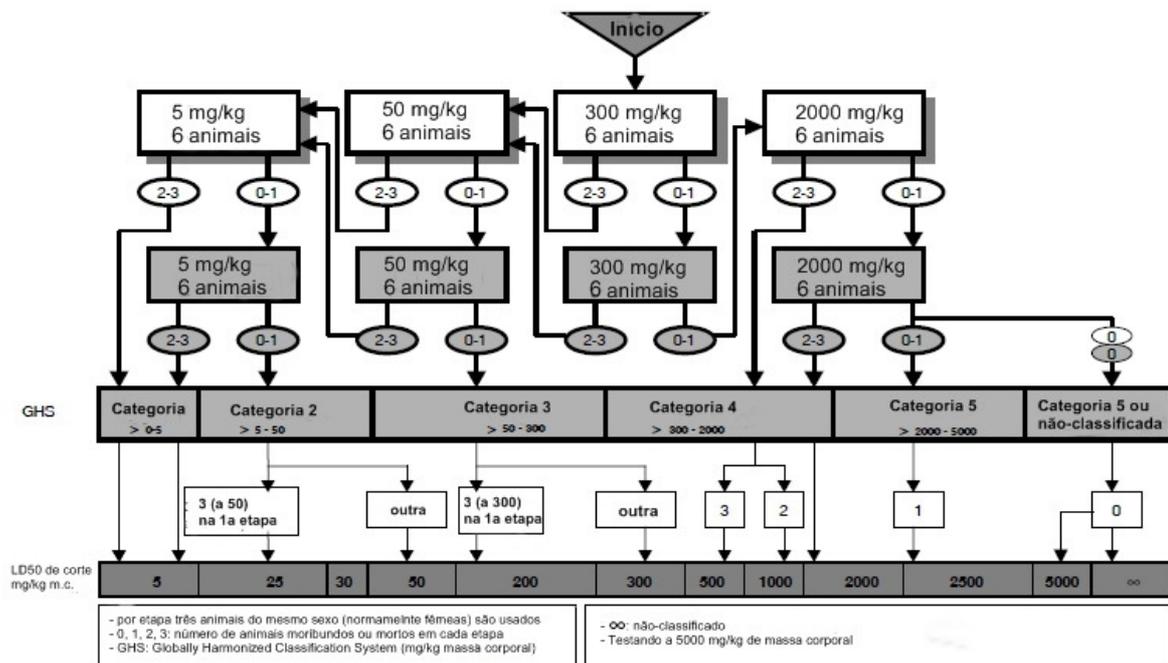


Figura 2.8 – Fluxograma do experimento de avaliação da toxicidade aguda *in vivo*.

O alimento foi restituído três a quatro horas após a administração dos compostos vegetais. O consumo de água foi *ad libitum* (à vontade). Durante as primeiras 24 h, as ratas foram observadas quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade nos períodos de 0, 15, 30, 60 min, 2, 3, 4, 8, 24 h e diariamente durante catorze dias após administração. A variação de massa corporal, o consumo de água e alimento foram avaliados semanalmente.

Os sinais de toxicidade incluindo o tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade foram registrados para cada animal em ficha de screening toxicológico. Foram observados parâmetros que permitiram avaliar alterações em:

- I. Estado consciente, disposição e comportamento: atividade geral, irritabilidade, vocalização, posição recumbente, posição lateral, *grooming* (hábito de coçar o nariz), comportamento compulsivo, automutilação, permanência em canto de gaiola.
- II. Atividade motora e tônus muscular: Resposta ao aperto de cauda, endireitamento, força para agarrar, tônus muscular, ataxia.
- III. Reflexos: corneal, auricular.
- IV. Sistema nervoso central (SNC): remores, convulsão, fenômeno de Straub, hipnose.
- V. Sistema nervoso autônomo (SNA): lacrimejamento, salivação, micção, defecação, pilo ereção, respiração.
- VI. Outras alterações: hipotermia, rigidez abdominal, edema, prurido, alterações na pele, sangramento de orifícios, diarreia e número de animais mortos ou eutanasiados mediante morte iminente (estado moribundo), quando for o caso.

As observações registradas foram tabuladas numa escala que depende da ausência ou presença do evento no início do estudo (“animal normal”). Nos casos em que o evento foi ausente (ex: convulsão, tremor, comportamento compulsivo), foi atribuído a pontuação 0 (zero) ao valor “normal” e considerou-se a escala de 0 a 4 correspondendo, respectivamente, a ausente, raro, pouco, moderado, intenso. Nos casos em que o evento foi inicialmente presente (ex: tônus muscular, respiração, defecação), foi atribuído a pontuação 4 (quatro) ao valor “normal” e considerou-se a escala de 0 a 8 correspondendo, respectivamente, a ausente, raro, pouco, diminuído, presente (normal), aumentado, moderado, elevado, intenso.

Ao fim do período de observação, todos os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia\* e necropsia. Os seguintes órgãos foram removidos: coração, pulmão, fígado, baço, rins (com supra renal), cérebro e útero (com ovários). Após a retirada dos órgãos, os mesmos foram pesados e submetidos ao exame macroscópico para identificação de possíveis áreas sugestivas de alteração patológica e fixados em formaldeído 10% tamponado (pH 7,2) para análise microscópica em casos justificados.

\*método de eutanásia: por dose exacerbada de sedativo que, no caso, se tratava de cetamina/xilazina.

## ***Tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona como agentes quelantes para potencial uso em medicina***

As tiossemicarbazonas têm sido largamente investigadas no campo da Química Medicinal e Farmacêutica devido ao amplo espectro de atividades biológicas que apresentam, incluindo atividades antibacteriana, antitumoral, antiviral, antiprotozoária, e outras.<sup>1</sup>

A preparação de tiossemicarbazonas é bastante explorada e descrita na literatura. Em geral, podem ser empregadas duas formas de obtenção: a direta, pela reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas com as tiossemicarbazidas ou a indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas, utilizando hidrazina (NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) e outros reagentes, seguida de condensação com o derivado carbonilado específico.<sup>2</sup>

Recentemente descrevemos a ação citotóxica de 2-benzoilpiridina *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* tolúil tiossemicarbazonas contra células de leucemia humana<sup>3</sup>. De modo geral a diminuição da capacidade quelante de tiossemicarbazonas leva a uma diminuição de suas bioatividades. De fato, muitas das atividades biológicas dessa classe de compostos estão relacionadas à sua habilidade em complexar o ferro da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) e assim, um menor efeito quelante levaria a uma redução da ação farmacológica.

Por outro lado, agentes quelantes destituídos de atividade biológica podem, em princípio, ser empregados na remoção de metais em pacientes com intoxicação ou em pacientes portadores de doenças neurodegenerativas associadas à presença de excesso de metais.

Assim neste capítulo foram preparadas *N*(3)-fenil tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona com diferentes grupos substituintes, em um total de oito tiossemicarbazonas inéditas, as quais foram avaliadas quanto às suas atividades citotóxicas e antimicrobianas. Ao final foi escolhido um dos compostos para avaliação de toxidez *in vivo*.

A notação empregada será a seguinte: acetofenona- *N*(3)-*meta*-clorofenil-, *N*(3)-*meta*-flúorfenil-, *N*(3)-*meta*-nitrofenil-, *N*(3)-*orto*-tolúil-, *N*(3)-*meta*-tolúil- e *N*(3)-*para*-tolúil-tiossemicarbazonas (HAc3*m*Cl, HAc3*m*F, HAc3*m*NO<sub>2</sub>, HAc3*o*T, HAc3*m*T e HAc3*p*T); e benzofenona- *N*(3)-*meta*-clorofenil-, *N*(3)-*meta*-flúorfenil-, *N*(3)-*meta*-nitrofenil-, *N*(3)-*orto*-tolúil-, *N*(3)-*meta*-tolúil- e *N*(3)-*para*-tolúil- tiossemicarbazonas (HBz3*m*Cl, HBz3*m*F, HBz3*m*NO<sub>2</sub>, HBz3*o*T, HBz3*m*T e HBz3*p*T) (ver Figura 3.1). As tiossemicarbazonas HAc3*m*Cl, HAc3*m*F, HAc3*m*NO<sub>2</sub>, HBz3*m*Cl, HBz3*m*F, HBz3*m*NO<sub>2</sub>, HBz3*o*T e HBz3*m*T são inéditas.

<sup>1</sup> H. Beraldo, D. Gambino, Mini. Rev. Med. Chem. 4 (2004) 31.

<sup>2</sup> R. P. Tenório, A. J. S. Góes. Quim. Nova. 28 (2005) 1030.

<sup>3</sup> K.S.O. Ferraz, L. Ferandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.F. Leite, E.M. Souza-Fagundes, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7138.

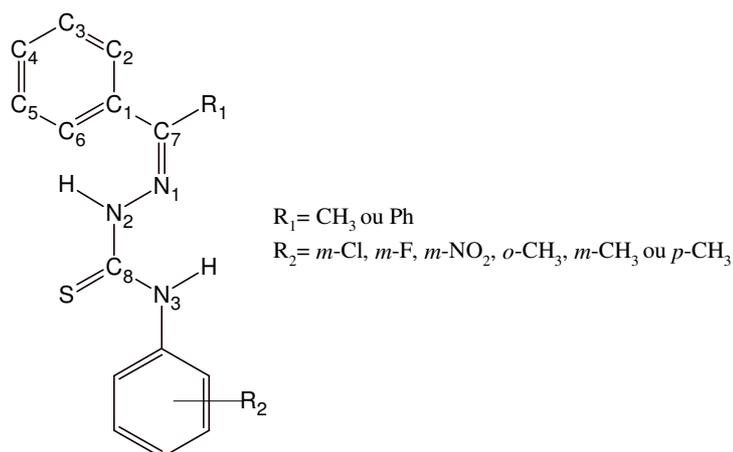


Figura 3.1– Estrutura geral das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona ( $R_1 = \text{CH}_3$ ) e de benzofenona ( $R_1 = \text{Ph}$ ).

Os compostos obtidos foram caracterizados através de análise elementar, temperaturas de fusão e por meio de análise de seus espectros no infravermelho e de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC e DEPT 135. Foram obtidos monocristais de algumas tiossemicarbazonas e a estrutura cristalina determinada por difração de Raios-X.

*3.1- Análises de acetofenona- N(3)-meta-clorofenil-, N(3)-meta-flúorfenil- e N(3)-meta-nitrofenil- tiossemicarbazonas (HAc3mCl, HAc3mF, HAc3mNO<sub>2</sub>) e benzofenona- N(3)-meta-clorofenil-, N(3)-meta-flúorfenil-, N(3)-meta-nitrofenil-, N(3)-orto-toluil- e N(3)-meta-toluil-tiossemicarbazonas (HBz3mCl, HBz3mF e HBz3mNO<sub>2</sub>, HBz3oT e HBz3mT)*

*Microanálises, cores, massas molares e temperaturas de fusão*

A Tabela 3.1.1 apresenta os rendimentos das reações (Rend.) assim como as cores, massas molares (MM) e temperaturas de fusão das tiossemicarbazonas. HAc3oT (**1**), HAc3mT (**2**), HAc3pT (**3**) e HBz3pT (**4**) foram preparadas anteriormente por outros grupos<sup>4,5</sup> e por isso não aparecem nas tabelas de caracterização 3.1.1 a 3.1.6.

<sup>4</sup> T. V Saraswathi, V. Ranga, V. R Srinivasan, M. Ramaiah, Ind. J. Chem. 10 (1972) 1151.

<sup>5</sup> V.K. Panchal, U.R. Dhruv, P.B. Patel, J. Instit. Chem. (India) 67 (1995) 86.

Tabela 3.1.1- Dados analíticos obtidos para as tiossemicarbazonas inéditas derivadas de acetofenona e benzofenona

Composto		Rend. (%)	Cor	MM g mol <sup>-1</sup>	Temp. de fusão (°C)
5	HAc3mCl	68	Branca	303,81	135 -137
6	HAc3mF	99	Branca	287,35	162 -165
7	HAc3mNO <sub>2</sub>	92	Amarela	330,36	135 -137
8	HBz3oT	66	Branca	345,46	138 -140
9	HBz3mT	73	Branca	345,46	160 -161
10	HBz3mCl	70	Branca	365,88	122-123
11	HBz3mF	88	Branca	349,42	136 -138
12	HBz3mNO <sub>2</sub>	79	Alaranjada	376,43	141-144

*Espectroscopia no Infravermelho*

As atribuições das bandas nos espectros no infravermelho das tiossemicarbazonas estão apresentadas na tabela 3.1.2. Os espectros no infravermelho apresentam bandas entre 3342-3159 cm<sup>-1</sup> atribuídas aos estiramentos  $\nu(\text{N-H})$ <sup>6</sup>. A banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C=N})$ <sup>7</sup> aparece entre 1588-1516 cm<sup>-1</sup>. Já a banda de baixa intensidade que aparece na região entre 867-780 cm<sup>-1</sup> é atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C=S})$ <sup>3</sup>. As figuras 3.2 e 3.3 mostram os espectros de HAc3mCl (5) e HBz3mCl (10).

Tabela 3.1.2 - Atribuições das principais absorções na região do infravermelho (cm<sup>-1</sup>) das tiossemicarbazonas inéditas derivadas de acetofenona e benzofenona

Composto	$\nu(\text{N3-H})$	$\nu(\text{N2-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=S})$
HAc3mCl (5)	3295F	3239m	1520F	793f
HAc3mF (6)	3299F	3264m	1520F	787f
HAc3mNO <sub>2</sub> (7)	3277F	3191F	1531F	867f
HBz3oT (8)	3331F	3159m	1516F	816f
HBz3mT (9)	3342F	3314F	1541F	788f
HBz3mCl (10)	3342F	3292F	1588F	804f
HBz3mF (11)	3302F	3198F	1546F	780f
HBz3mNO <sub>2</sub> (12)	3340F	3279F	1543F	864f

\*F = forte; f = fraca; m = média.

<sup>6</sup> D.X. West, H. Gegremedhin, T.J. Romack, A.E. Liberta, Transition Met. Chem. 19 (1994) 426.

<sup>7</sup> U.L. Kala, S. Suma, M.R.P. Kurup, S. Krishnan, RP. John, Polyhedron. 26 (2007) 1427.

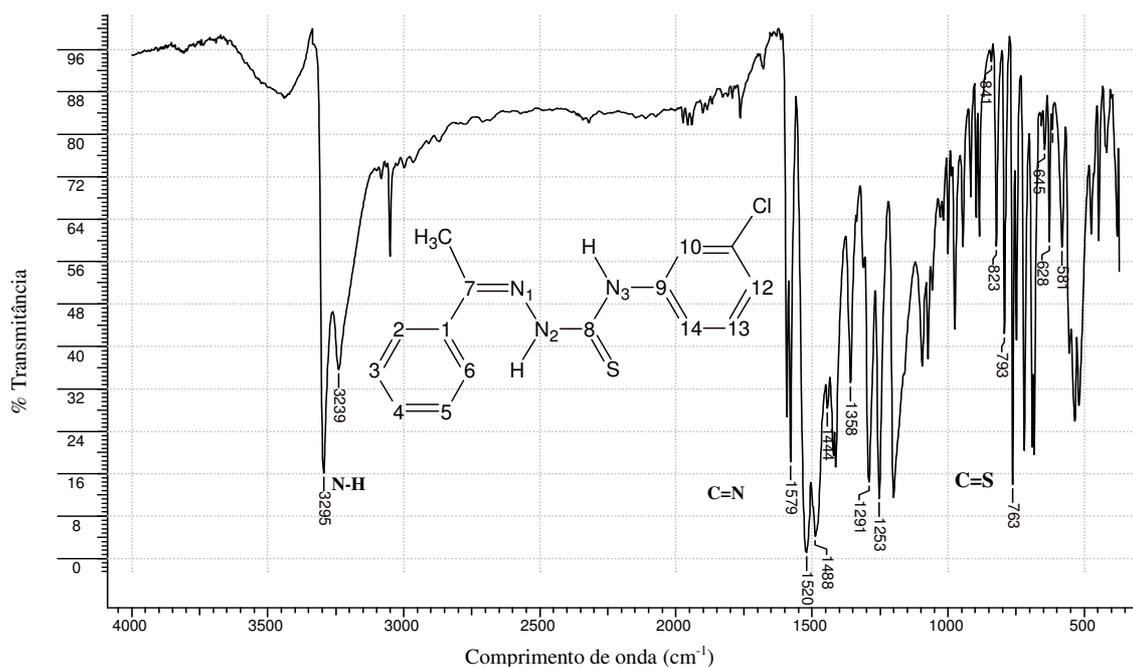


Figura 3.2 - Espectro no infravermelho de HAc3mCl (5) obtido em pastilha de KBr na região entre 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

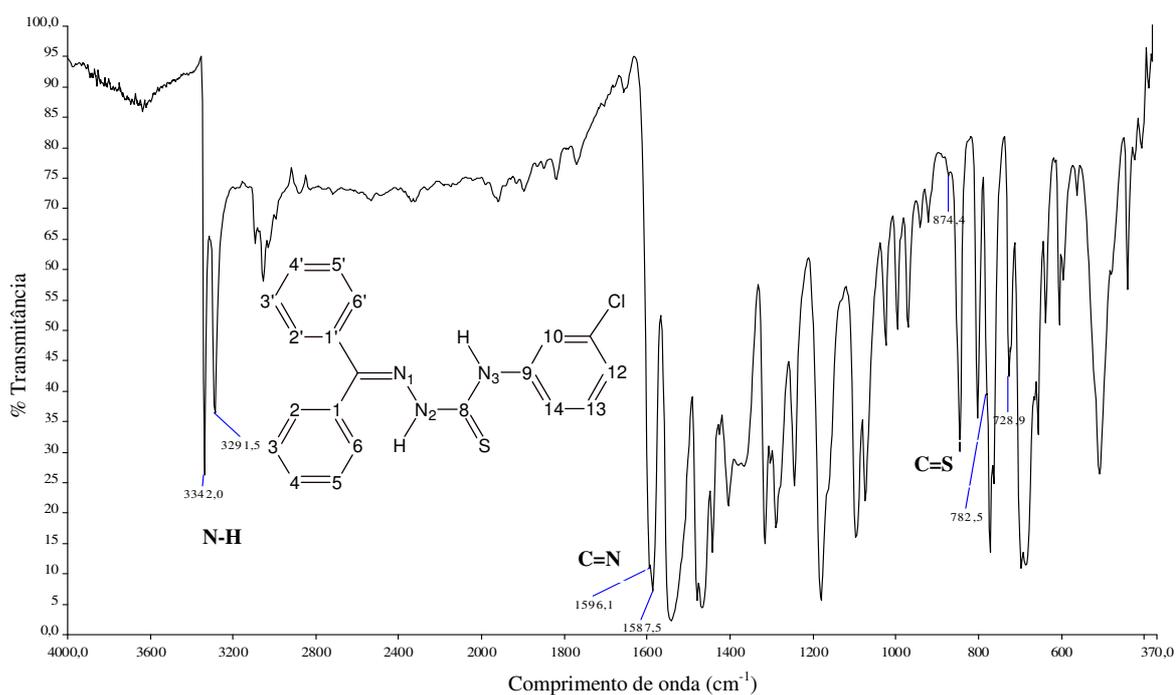


Figura 3.3 -Espectro no infravermelho de HBz3mCl (10) obtido na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, em pastilha de KBr.

## Ressonância Magnética Nuclear

Os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 das tiossemicarbazonas encontram-se nas tabelas 3.1.3 e 3.1.4. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona não foi possível observar a presença espécies isoméricas.

Os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do anel aromático contendo o átomo de flúor como substituinte em  $\text{HAc3mF}$  (**6**) e  $\text{HBz3mF}$  (**11**) aparecem duplicados, pois o número de spin para flúor é  $I = 1/2$ , ou seja, os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sofrem acoplamentos com o núcleo do flúor. Nas Figuras 3.4 a 3.7 encontram-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos (**6**) e (**11**).

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona os sinais dos dois anéis benzênicos aparecem em diferentes deslocamentos químicos devido à influência do hidrogênio ligado ao  $\text{N2}$ .

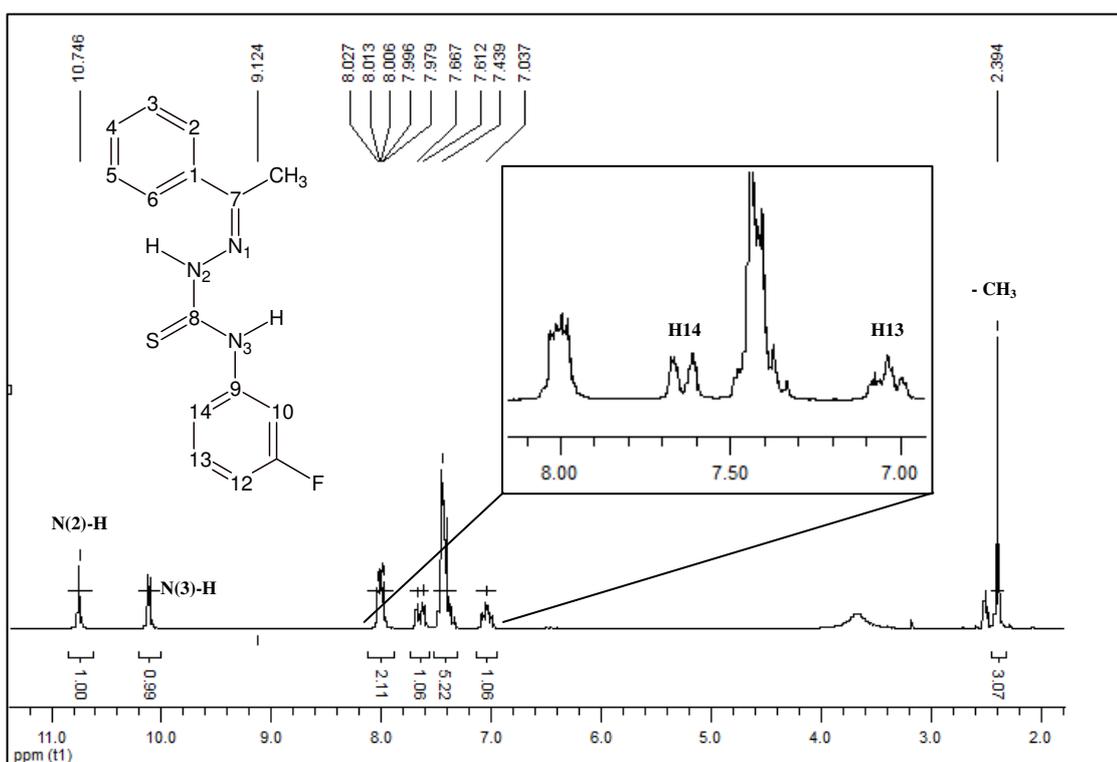


Figura 3.4 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para  $\text{HAc3mF}$  (**6**) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

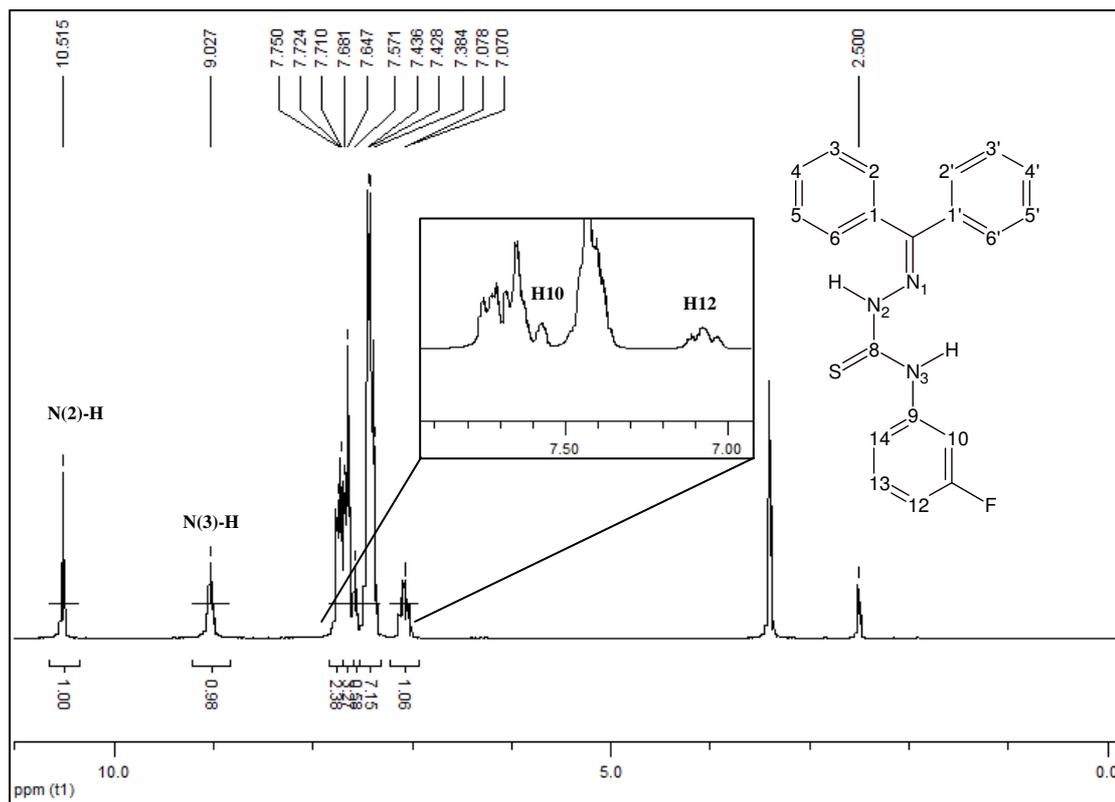
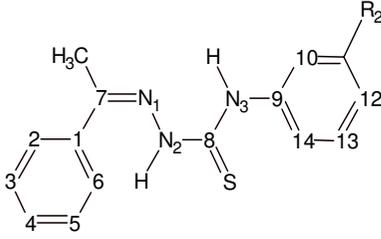
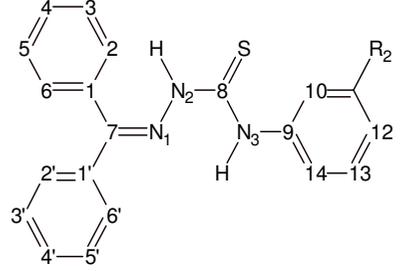


Figura 3.5 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para HBz3mF (**11**)  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

Tabela 3.1.3 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm), constante de acoplamento ( $J$ ) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  das tiossemicarbazonas inéditas derivadas de acetofenona e benzofenona (DMSO- $d_6$ , 200 MHz)

								
Atribuições (M) n°	<b>HAc3mCl (5)</b>	<b>HAc3mF (6)</b>	<b>HAc3mNO<sub>2</sub> (7)</b>	<b>HBz3oT (8)</b>	<b>HBz3mT (9)</b>	<b>HBz3mCl (10)</b>	<b>HBz3mF (11)</b>	<b>HBz3mNO<sub>2</sub> (12)</b>
<b>H2, H6 (d) 1</b>	(8,04-7,99); $^1J = 6,01$ ; $^2J = 3,26$	(8,03-7,98); $^1J = 6,17$ ; $^2J = 2,73$	8,03	(7,77-7,73)	(7,76-7,72); $^1J = 7,90$	(7,74-7,65)	(7,75-7,71)	8,09
<b>H3, H4, H5 (m) 1</b>	(7,44-7,39)	(7,44-7,33)	7,43	(7,69-7,66)	(7,43-7,37)	(7,74-7,65)	(7,43-7,39)	(7,75-7,66)
<b>N(2)H (s) 1</b>	10,77	10,78	10,93	10,33	10,39	10,50	10,52	10,72
<b>N(3)H (s) 1</b>	10,12	10,11	10,33	8,77	8,81	9,01	9,03	9,25
<b>H10 (s) 1</b>	7,79	7,67-7,61	8,65	-	7,37	(7,74-7,65)	7,58	8,62
<b>H12 (d) 1</b>	(7,28-7,24); $^1J = 8,07$	(7,44-7,33); $^1J = 11,15$ ; $^2J = 2,23$	(8,11-8,07)	(7,30-7,25)	-	-	-	-
<b>H13* (t) 1</b>	(7,43-7,39); $^1J = 8,07$	7,04	7,64; $^1J = 8,13$	(7,30-7,25)	(7,08-7,04); $^1J = 7,26$	(7,31-7,27); $^1J = 7,29$	(7,68-7,65); $^1J = 6,08$	(7,75-7,66)
<b>H14 (d) 1</b>	(7,61-7,57)	7,64	(8,07-8,03)	(7,30-7,25)	7,27; $^1J = 7,56$	(7,45-7,37); $^1J = 7,92$	(7,68-7,65)	7,43
<b>CH<sub>3</sub> (acetil)</b>	3,39	2,39	2,41	-	-	-	-	-

\*Desdobramento padrão; no entanto, devido à sobreposição de sinais são apenas observados multipletos.

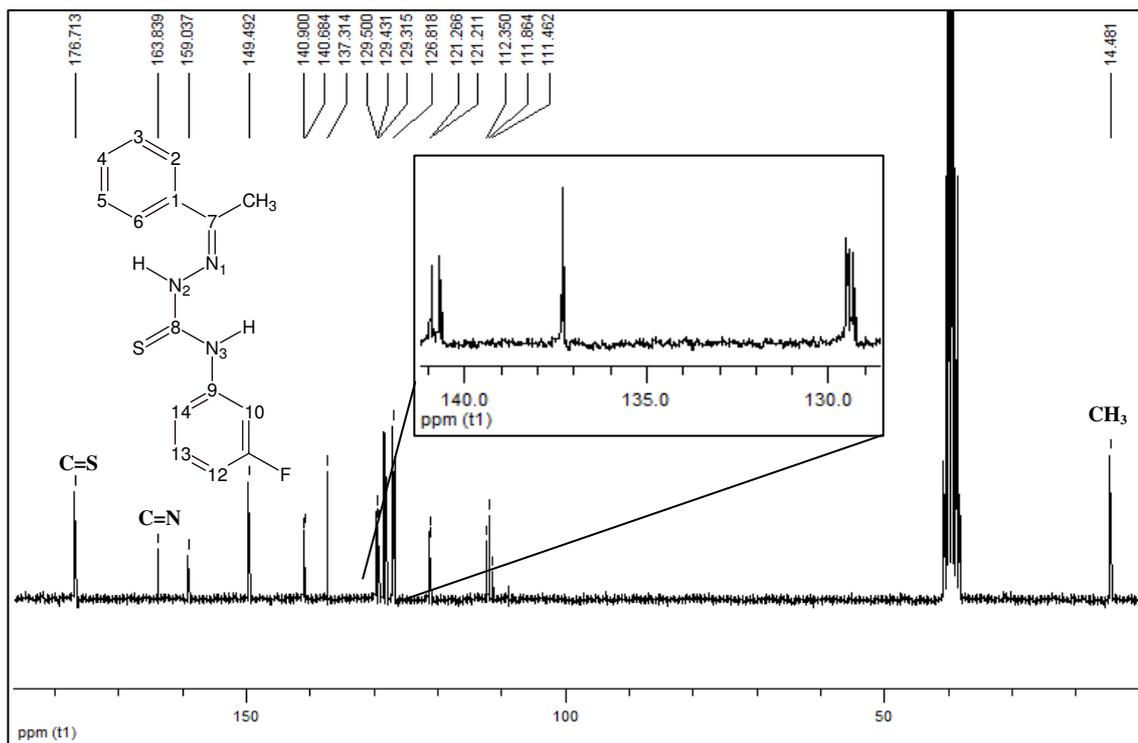


Figura 3.6 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para HAc3mF (6) em DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz.

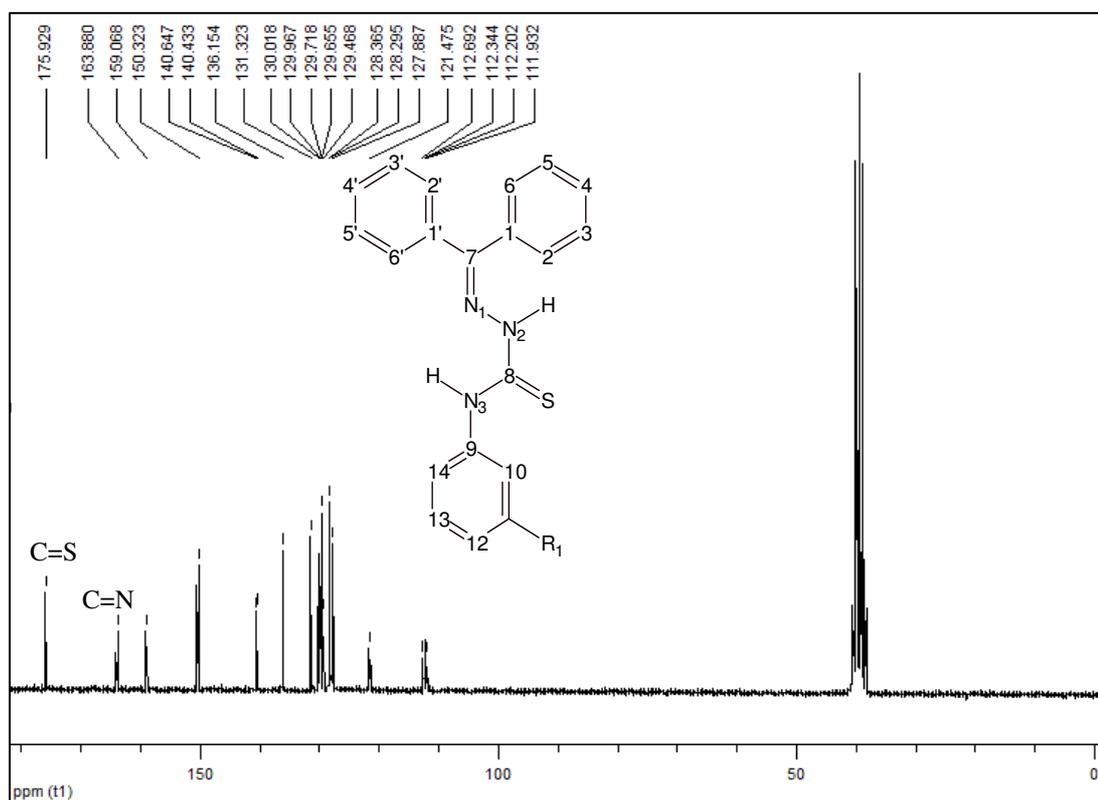
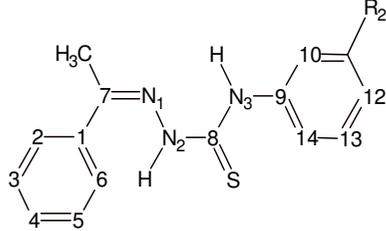
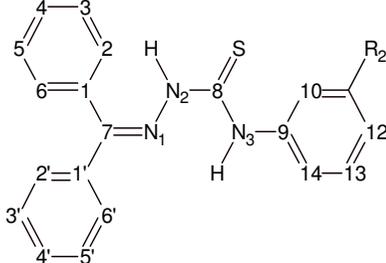


Figura 3.7 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para HBz3mF (11) em DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz.

Tabela 3.1.4 - Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 das tiossemicarbazonas inéditas derivadas de acetofenona e benzofenona (DMSO- $d_6$ , 200 MHz)

									
Atribuições	DEPT	HAc3mCl (5)	HAc3mF (6)	HAc3mNO <sub>2</sub> (7)	HBz3oT (8)	HBz3mT (9)	HBz3mCl (10)	HBz3mF (11)	HBz3mNO <sub>2</sub> (12)
<b>C1</b>	-	132,08	136,14	137,28	135,34	138,68	136,14	136,15	136,17
<b>C2, C6</b>	↑	126,85	126,82	126,92	127,70	129,83	128,37	127,62	127,95
<b>C3, C5</b>	↑	128,19	128,19	128,21	129,77	128,26	129,73	128,37	129,66
<b>C4</b>	↑	129,44	129,32	129,54	129,77	129,76	129,99	129,97	129,66
<b>C7</b>	-	149,51	150,39	150,14	149,29	149,67	150,39	150,32	147,24
<b>C8</b>	-	176,83	176,71	176,97	176,71	175,94	176,01	175,93	176,15
<b>C9</b>	-	140,58	140,90-140,68	140,34	137,84	137,39	140,31	140,65-140,43	140,07
<b>C10</b>	↑	125,12	112,36 -111,86	119,74	136,16	123,00	130,03	112,34-112,20	119,82
<b>C11</b>	-	137,32	163,84-159,04	147,19	128,54	136,15	132,18	163,88-159,07	150,98
<b>C12</b>	↑	124,92	129,50-129,32	131,98	130,00	126,30	125,34	112,69-111,93	131,37
<b>C13</b>	↑	129,49	111,46	129,11	126,84	128,29	130,07	130,02-129,97	128,44
<b>C14</b>	↑	124,22	129,50	119,63	128,00	129,83	124,36	129,72-129,66	119,97
<b>CH<sub>3</sub>(acetil)</b>	↑	14,49	14,48	14,59					

## Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona substituídas em *N*(3) serão discutidos posteriormente no capítulo 4, que trata de seus complexos de zinco.

## 3.2- Cristalografia por Difração de Raios X

Foram determinadas estruturas cristalográficas das tiossemicarbazonas HAC3*o*T (**1**), HAC3*m*T (**2**), HAC3*m*F (**6**) e HBz3*o*T (**8**). Os cristais foram obtidos por difusão lenta em uma solução de DMSO/acetona. Os dados cristalográficos e de refinamento para as tiossemicarbazonas estão apresentados na tabela 3.2.1. As figuras 3.8 e 3.9 mostram o diagrama molecular das estruturas das tiossemicarbazonas (**1**), (**2**) e (**8**) e o empacotamento na estrutura de (**6**), respectivamente.

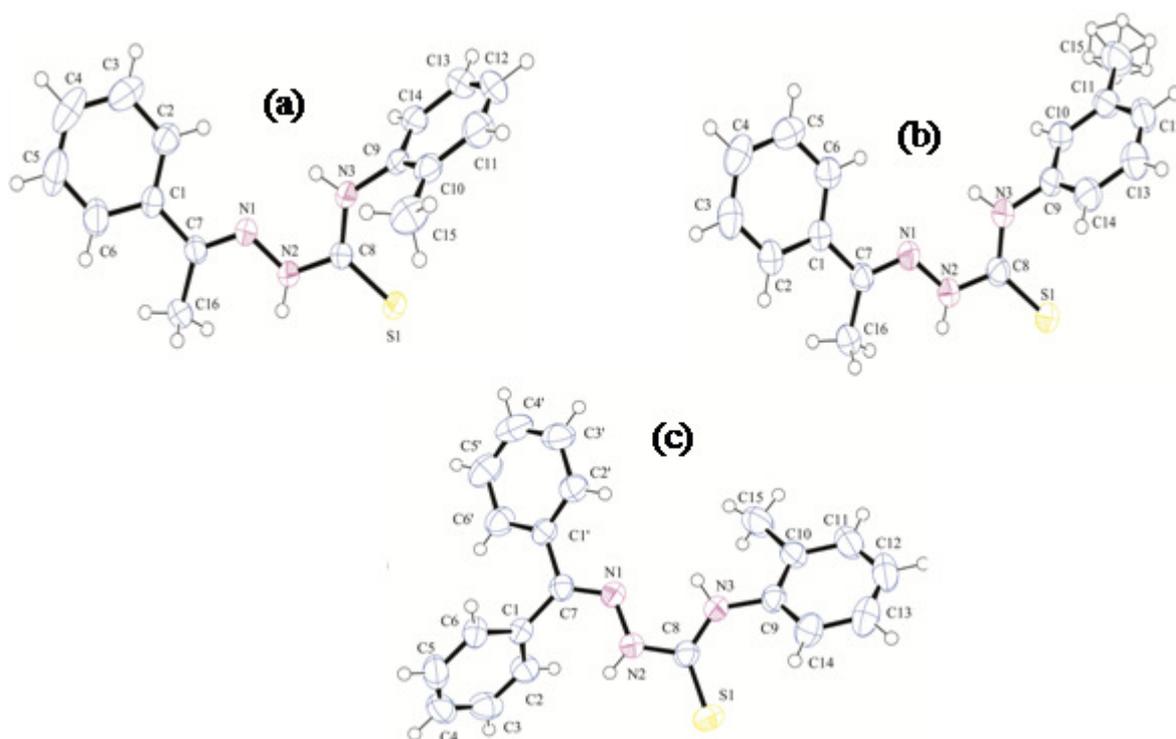


Figura 3.8 – Diagrama molecular das tiossemicarbazonas (a) HAC3*o*T (**1**), (b) HAC3*m*T (**2**) com o grupo metila do carbono C<sub>15</sub> em desordem e (c) HBz3*o*T (**8**).

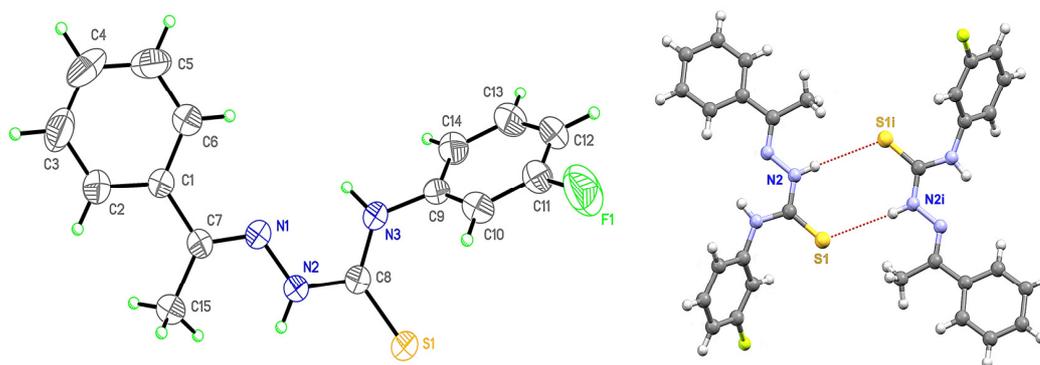


Figura 3.9 – Estrutura de HAC3mF (**6**) e seu dímero formado por duas ligações de hidrogênio.

Todas as tiossemicarbazonas encontram-se na conformação *EE* em relação às ligações C7=N1 e C8–N2 e o sistema cristalino é monoclinico, exceto para HAC3mF (**6**) que cristaliza-se no sistema triclinico.

A estrutura de HAC3pT foi determinada por outros pesquisadores<sup>8</sup>. A Tabela 3.2.2 exibe as distâncias e ângulos de ligação de HAC3oT (**1**), HAC3mT (**2**), HAC3pT (**3**) e HAC3mF (**6**) para comparação e o que observa-se é que as distâncias e ângulos de ligação são muito próximas. O grupo substituinte no anel e a posição dos substituintes no anel fenílico não afetam significativamente o comprimento das ligações e os ângulos do esqueleto das tiossemicarbazonas.

Entre as estruturas HAC3oT, HAC3mT e HAC3pT a maior variação de ângulo ocorre entre os átomos C8–N3–C9 devido aos efeitos estéricos provocados pela posição do grupo toluil. Comparando-se as estruturas HAC3oT (**1**) e HBz3oT (**8**), observa-se que a mudança do grupo ligado ao carbono C7 provoca variações de aproximadamente 0,01 Å entre as ligações formadas pelos átomos do esqueleto da tiossemicarbazona e de 1-10 ° nos ângulos formados entre os átomos N1–C7–C1, N3–C8–N2, C8–N3–C9 e N2–C8–S1.

Todas as estruturas apresentam uma ligação de hidrogênio intermolecular N2–H···S1, cujo ângulo N–H–S é próximo a 175 °, exceto o composto HBz3oT (**8**) que apresenta apenas uma ligação intramolecular N3–H···N1, com um ângulo de aproximadamente 113 °. O composto HAC3oT (**1**) possui ainda uma ligação de hidrogênio intramolecular N3–H···N1 (ver Tabela 3.2.3).

<sup>8</sup> Z. Yan-Ling, W. Chang-Zeng, Z. Fu-Juan, Acta Cryst. E67 (2011) 1547.

Tabela 3.2.1 – Resumo da coleção de dados e refinamento para HAc3oT (1), HAc3mT (2), HAc3mF (6) e HBz3oT (8)

Composto	(1)	(2)	(6)	(8)
Fórmula empírica	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> S	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> S	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> S	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> S
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	283,39	283,39	301,38	345,45
Cor	Incolor	Incolor	Amarelo	Incolor
Dimensões do cristal (mm <sup>3</sup> )	0,49 x 0,21 x 0,13	0,46 x 0,10 x 0,07	0,28 x 0,20 x 0,08	0,25 x 0,21 x 0,19
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Radiação, λ (Å)	MoK <sub>α</sub> , 0,71073	CuK <sub>α</sub> , 1,54184	MoK <sub>α</sub> , 0,71073	MoK <sub>α</sub> , 0,71073
Intervalo de θ (°)	5,16 a 26,37	3,63 a 58,93	3,00 a 26,37	5,11 a 26,37
Intervalos de hkl	-7 ≤ h ≤ 6, -13 ≤ k ≤ 12, -20 ≤ l ≤ 30	-11 ≤ h ≤ 11, -3 ≤ k ≤ 6, -25 ≤ l ≤ 27	-6 ≤ h ≤ 7, -10 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 13	-6 ≤ h ≤ 7, -10 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 13
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> /c	P 2 <sub>1</sub> /c	P $\bar{1}$	P 2 <sub>1</sub> /n
a (Å)	5,6728(2)	10,6038(3)	5,8624(2)	9,8993(3)
b (Å)	10,7626(3)	5,68780(10)	10,5083(4)	16,7617(4)
c (Å)	24,3856(7)	24,7390(9)	12,0065(4)	12,1103(4)
α (°)	90	90	74,714(3)	90
β (°)	92,582(3)	99,859(3)	86,591(3)	113,448(4)
γ (°)	90	90	89,559(3)	90
Volume (Å <sup>3</sup> )/Z	1487,33(8) / 4	1470,03(7) / 4	712,19(4) / 2	1843,51(9) / 4
F(000)	600	600	316	728
Densidade calculada (mg m <sup>-3</sup> )	1,266	1,280	1,405	1,245
Coefficiente de absorção μ (mm <sup>-1</sup> )	0,211	1,888	0,235	0,183
Reflexões coletadas	10479	6668	5414	12963
Reflexões únicas/R(int)	3016 / 0,0389	2121 / 0,0327	2901 / 0,0218	3732 / 0,0395
Parâmetros refinados/restrições	183 / 0	182 / 0	181 / 0	227 / 0
R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0348, wR2 = 0,0952	R1 = 0,0361, wR2 = 0,0957	R1 = 0,0430, wR2 = 0,1071	R1 = 0,0377, wR2 = 0,0986
R (all)	R1 = 0,0477, wR2 = 0,0983	R1 = 0,0502, wR2 = 0,1042	R1 = 0,0694, wR2 = 0,1147	R1 = 0,0554, wR2 = 0,1032
Qualidade de ajuste, S	1,087	1,012	0,953	1,028
Δρ min/max (e.Å <sup>3</sup> )	0,182 / 0,162	0,161 / 0,175	-0,263 / 0,368	-0,200 / 0,180

Tabela 3.2.2 - Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de HAc3oT (1), HAc3mT (2), HAc3pT<sup>8</sup> (3), HAc3mF (6) e HBz3oT (8). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	Distancias (Å)				
	(1)	(2)	(3)	(6)	(8)
S1-C8	1,6755(13)	1,676(2)	1,6744(18)	1,670(2)	1,6606(14)
C1-C7	1,4828(19)	1,485(3)	1,482(2)	1,479(3)	1,4795(18)
N1-C7	1,2810(17)	1,287(3)	1,286(2)	1,281(2)	1,2922(16)
N1-N2	1,3802(14)	1,382(2)	1,3764(19)	1,374(2)	1,3691(15)
N2-C8	1,3533(17)	1,358(2)	1,357(2)	1,354(2)	1,3597(16)
N3-C8	1,3372(17)	1,339(3)	1,341(2)	1,341(3)	1,3379(17)
N3-C9	1,4290(18)	1,425(3)	1,426(2)	1,421(2)	1,4144(16)
Átomos	Ângulos (°)				
C2-C1-C7	121,03(12)	120,77(19)	120,99(17)	121,66(19)	121,16(11)
N1-C7-C1	115,23(12)	115,62(18)	115,48(16)	115,97(18)	124,96(11)
C7-N1-N2	119,29(11)	118,70(17)	118,66(15)	118,94(17)	118,83(11)
N1-N2-C8	118,00(11)	118,53(17)	118,79(14)	119,17(16)	118,83(11)
N3-C8- N2	114,76(11)	115,36(18)	114,93(15)	114,52(17)	113,47(11)
C8-N3-C9	126,74(11)	125,75(17)	127,04(15)	127,14(17)	131,99(12)
N2-C8-S1	120,57(10)	119,62(16)	119,61(13)	119,81(15)	118,39(10)

Tabela 3.2.3 - Ligações de hidrogênio observadas para HAc3oT (1), HAc3mT (2), HAc3pT<sup>7</sup> (3), HAc3mF (6) e HBz3oT (8)

Composto	D-H...A	d(D-H) (Å)	D(H...A) (Å)	DHA (°)	d(D...A) (Å)
HAc3oT (1)	N(2)-H(2)...S(1)#2	0,86	2,792	173,6	3,6471(12)
	N(3)-H(3)...N(1)	0,86	2,14	110,2	2,5633(16)
HAc3mT (2)	N(2)-H(2)...S(1)#1	0,86	2,91	175,2	3,7718(18)
HAc3pT <sup>7</sup> (3)	N(2)-H(2)...S(1)#2	0,86	2,89	175,7	3,7498(16)
HAc3mF (6)	N(2)-H(2A)...S(1)#1	0,86	2,96	175,7	3,8143 (17)
HBz3oT (8)	N(3)-H(3)...N(1)	0,86	2,10	113,8	2,5732(15)

Transformação de simetria usada para gerar átomos equivalentes: #1 -x+1,-y+1,-z; #2 -x,-y+1,-z.

Alguns resultados aqui apresentados foram objeto do artigo intitulado *Structural studies on acetophenone- and benzophenone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) complexes*,

recentemente publicado em Journal of Molecular Structure (K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. da Silva, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, J. Mol. Struct. 1008 (2012) 102 - ver Anexo).

### 3.3 - Atividade Biológica

#### 3.3.1 Atividade antimicrobiana

Todas as tiossemicabazonas foram testadas contra o crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e de fungos *Candida albicans*. No entanto, nenhuma delas exibiu atividade antimicrobiana significativa.

#### 3.3.2 Atividade citotóxica

As tiossemicarbazonas HAc3oT (1), HAc3mT (2), HAc3mCl (4), HAc3mF (5) e HAc3mNO<sub>2</sub> (6) foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a proliferação de células leucêmicas K562. A 1 µM os compostos não inibiram a proliferação das células. As tiossemicarbazonas acetofenona- e benzofenona- *N*(3)-orto-toluil, *N*(3)-meta-toluil e *N*(3)-para-toluil (HAc3oT (1), HAc3mT (2), HAc3pT (3), HBz3pT (4), HBz3oT (8) e HBz3mT (9)) também foram avaliadas quanto às suas capacidades de inibir o crescimento de células leucêmicas HL-60 e Jurkat a 10 µM, porém demonstraram-se inativas. Os compostos foram também avaliados quanto à citotoxicidade frente a linhagens de células de glioblastoma humano U-87 e T-98. Na tabela 3.3.1 estão as porcentagens de morte celular de U-87 e T-98 na presença das tiossemicarbazonas a 1µM.

Tabela 3.3.1 - Porcentagem de morte celular de glioblastoma humanos U-87 e T-98 na presença das tiossemicarbazonas a 1 µM (%)

Composto	U-87	T-98
HAc3oT (1)	23,1 ± 14,3	13,6 ± 10,7
HAc3mT (2)	10,0 ± 12,8	1,5 ± 1,9
HAc3pT (3)	19,6 ± 9,0	20,9 ± 5,3
HAc3mCl (5)	23,6 ± 12,8	16,1 ± 8,6
HAc3mF (6)	31,9 ± 5,6	33,2 ± 2,3
HAc3mNO <sub>2</sub> (7)	18,6 ± 9,5	13,8 ± 5,8
HBz3oT(8)	28,2 ± 3,4	13,7 ± 4,0
HBz3mT (9)	16,5 ± 7,3	17,9 ± 8,5
HBz3pT (4)	17,0 ± 10,2	23,6 ± 10,3
HBz3mCl (10)	18,5 ± 8,7	18,2 ± 7,3
HBz3mF (11)	17,0 ± 5,8	19,5 ± 4,5
HBzm3NO <sub>2</sub> (12)	22,3 ± 9,0	18,3 ± 11,1

Não ocorreram diferenças significativas nas atividades citotóxicas exercidas pelas diferentes tiossemicarbazonas sobre a linhagem celular U87. A porcentagem de morte celular variou entre 31,9 – 10,0 %, sendo HAc3mF (**6**) a mais ativa e HAc3mT (**2**) a menos ativa. Resultados semelhantes foram obtidos contra células T98 em que a porcentagem de morte celular variou entre 33,2 - 1,5 %, sendo HAc3mF (**6**) a tiossemicarbazona mais ativa e HAc3mT (**2**) a menos ativa.

Comparações entre essas tiossemicarbazonas e seus análogos derivados de piridina mostram que as últimas são melhores agentes citotóxicos, sugerindo que uma maior capacidade quelante (N-N-S ao invés de N-S) poderia acarretar maior citotoxicidade. De fato, se considerarmos que o mecanismo de ação antitumoral das tiossemicarbazonas envolve a inibição da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, seja pela tiossemicarbazona livre que se coordena a um íon ferro(III) da estrutura da enzima, seja através de um complexo de ferro(II) que se oxida liberando um elétron que inativaria o radical livre presente na sub-unidade R2, uma menor capacidade quelante levaria a um menor efeito citotóxico. No entanto, a literatura relata vários exemplos de tiossemicarbazonas potencialmente bidentadas que apresentam ação antitumoral, e cujos mecanismos de ação são distintos do aqui mencionado.<sup>9</sup>

### 3.3.3 Toxicidade aguda

As tiossemicarbazonas em geral são ótimos agentes quelantes<sup>10</sup>. Essa característica é muito interessante e tem sido investigada para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes com Mal de Alzheimer. A doença de Alzheimer é muito complexa, e atualmente os tratamentos limitam-se aos sintomas. Uma das principais causas da doença pareceria ser o acúmulo de íons metálicos no cérebro, principalmente cobre(II) e zinco(II).<sup>11</sup>

HAc3mT (**3**) além de não mostrar atividade antimicrobiana, demonstrou o menor índice de atividade citotóxica. Esse comportamento, associado à sua capacidade quelante devida ao sistema N-S, faz com que o composto possa constituir um interessante protótipo de fármaco para a terapia do mal de Alzheimer. Assim em uma segunda etapa passamos a investigar seus efeitos tóxicos por meio de um estudo de toxicidade aguda *in vivo*.

HAc3mT foi denominado BAMT (benzoilacetofenona *N*(3)-*meta* tolúil tiossemicarbazona) no teste de toxicidade *in vivo*. Na dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> o composto não ocasionou nenhum sinal de toxicidade às ratas Wistar durante o estudo de toxicidade aguda pelo método de classes. Por esse motivo, repetiu-se o experimento aumentando-se a dose para 2000 mg kg<sup>-1</sup> de acordo com o fluxograma (ver capítulo 2, seção 2.5.4).

Um aumento da atividade geral foi observado na primeira hora para o grupo que recebeu o composto, porém o efeito foi reversível no período de observação subsequente (1 hora). Demais sinais

<sup>9</sup> W. Hernández, J. Paz, A. Vaisberg, E. Spodine, R. Richter, L. Beyer, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2008 (2008) 1.

<sup>10</sup> B.M. Paterson, P.S. Donnelly, *Chem. Soc. Rev.* (2011).

<sup>11</sup> L.E. Scott, C. Orvig, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4885.

de toxicidade não foram encontrados nas observações diárias realizadas nos treze dias subsequentes do *screening* toxicológico (ver tabelas 3.3.2 e 3.3.3).

Tabela 3.3.2 - Sinais observados no tratamento com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup>

Grupo	Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	T/M	Período de observação dos sinais	Sinais de toxicidade observados
<b>Controle (CMC 0,5%)</b>	0	6/0	5' - 14º dia	Sem sinais de toxicidade
<b>BAMT</b>	300	6/0	5' - 14º dia	Sem sinais de toxicidade

Nota: T/M = número de ratos tratados / número de mortes. Observações após administração = 5, 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 8 e 24 h, e diariamente até o 14º dia.

Tabela 3.3.3 - Sinais observados no tratamento com a dose de 2000 mg kg<sup>-1</sup>

Grupo	Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	T/M	Período de observação dos sinais	Sinais de toxicidade observados
<b>Controle (óleo de milho)</b>	0	6/0	5' - 14º dia	Sem sinais de toxicidade
<b>BAMT</b>	2000	6/0	5' - 1h 1h - 14º dia	Atividade geral (7) Sem sinais de toxicidade

Nota: T/M = número de ratos tratados / número de mortes. Observações após administração = 5, 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 8 e 24 h, e diariamente até o 14º dia. Escore normal: atividade geral (4).

Quanto à massa corporal dos animais e o consumo de alimentos, nenhuma alteração foi detectada, tanto na primeira como na segunda semana (ver figuras 3.10 e 3.11). O dado tabulado como semana 0 corresponde ao peso dos animais no dia da administração.

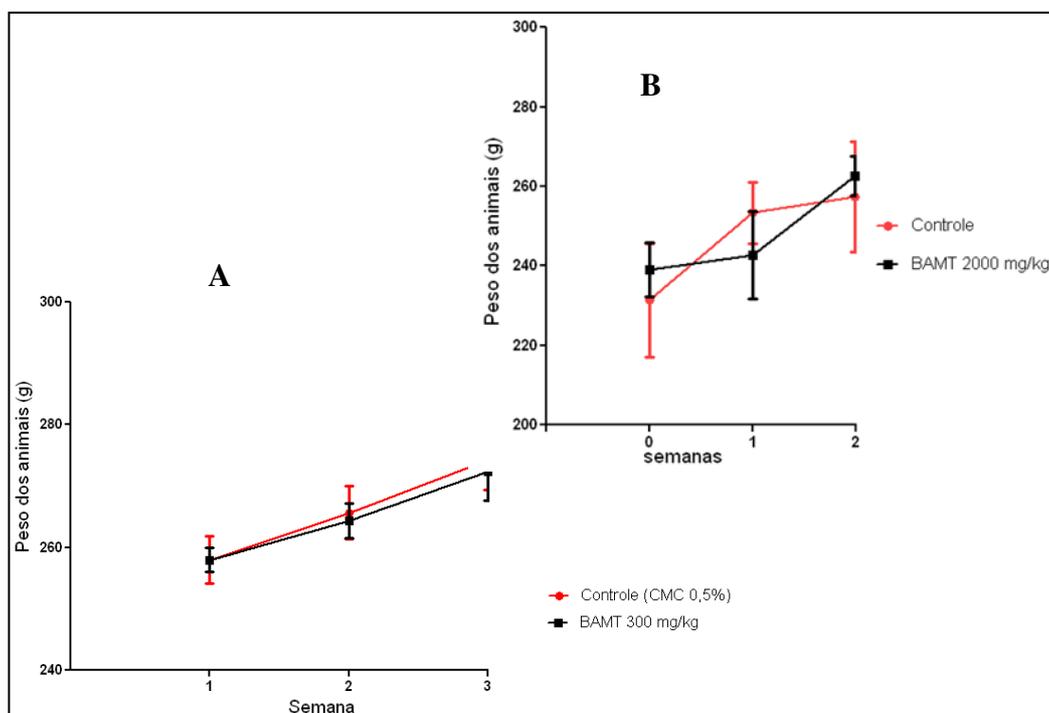


Figura 3.10- Massa corporal dos animais durante o experimento com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> (A) e de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (B) (n=6).

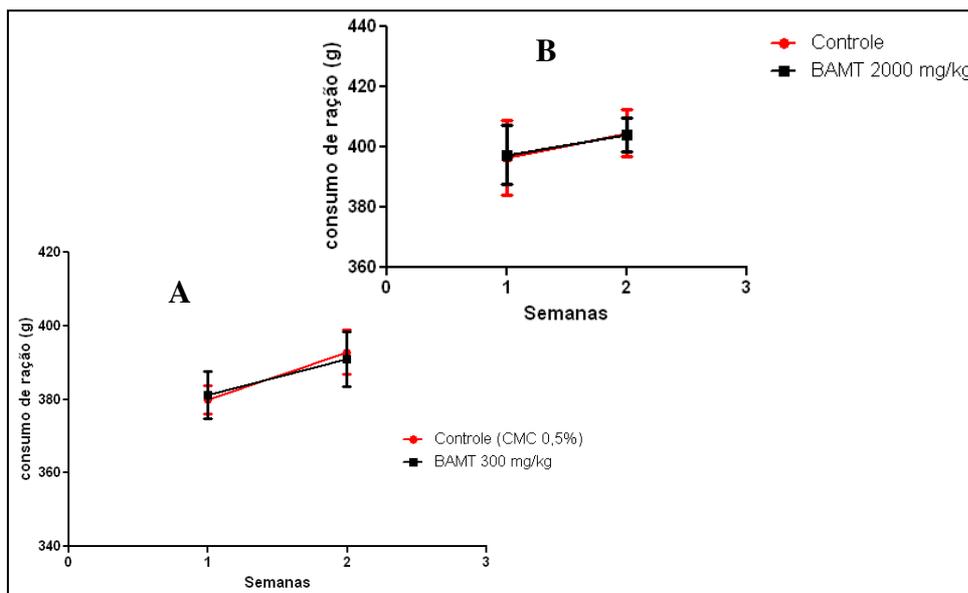


Figura 3.11 - Consumo de ração dos animais, em gramas, durante o experimento com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> (A) e de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (B) (n=6).

Em relação ao consumo de água, foi possível observar uma redução do consumo de água das ratas que consumiram o composto na dose de 2000 mg kg<sup>-1</sup> ao serem comparadas com as ratas do grupo controle (Figura 3.12).

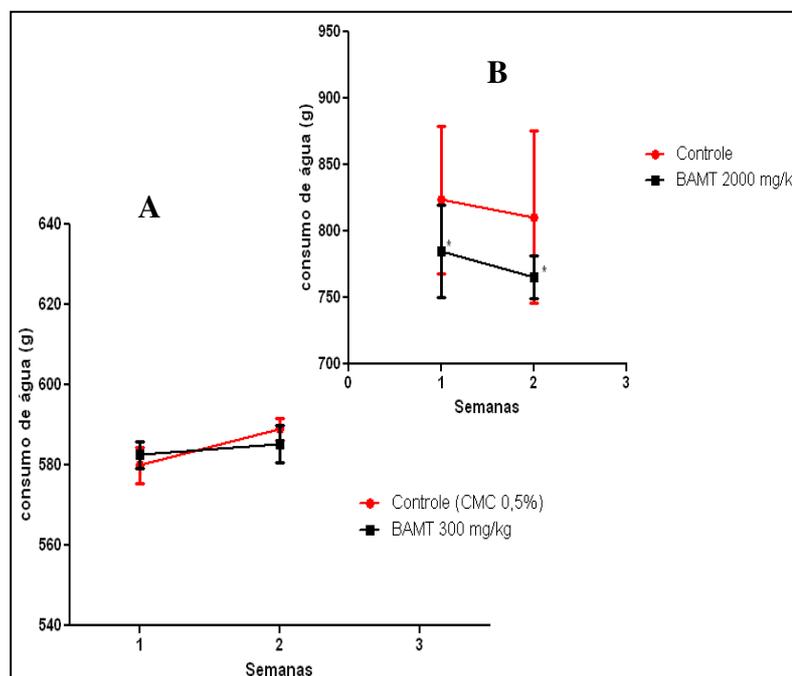


Figura 3.12 - Consumo de água (em gramas) durante o experimento com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> (A) e de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (B) (n=6). \*Significativamente diferente do grupo controle pelo teste de F (p<0,05).

Como o composto não provocou óbito, ao fim do período de observação de catorze dias, os animais foram submetidos à eutanásia. Os órgãos de todos os animais do grupo BAMT submetidos à

eutanásia apresentaram os mesmos aspectos morfológicos macroscópicos daqueles do grupo controle. Não foram detectadas alterações na estrutura, rigidez ou coloração das superfícies dos órgãos avaliados macroscopicamente. Também não foram encontradas diferenças estatísticas nas massas dos órgãos dos animais do grupo BAMT quando comparadas ao grupo controle (Figuras 3.13 e 3.14).

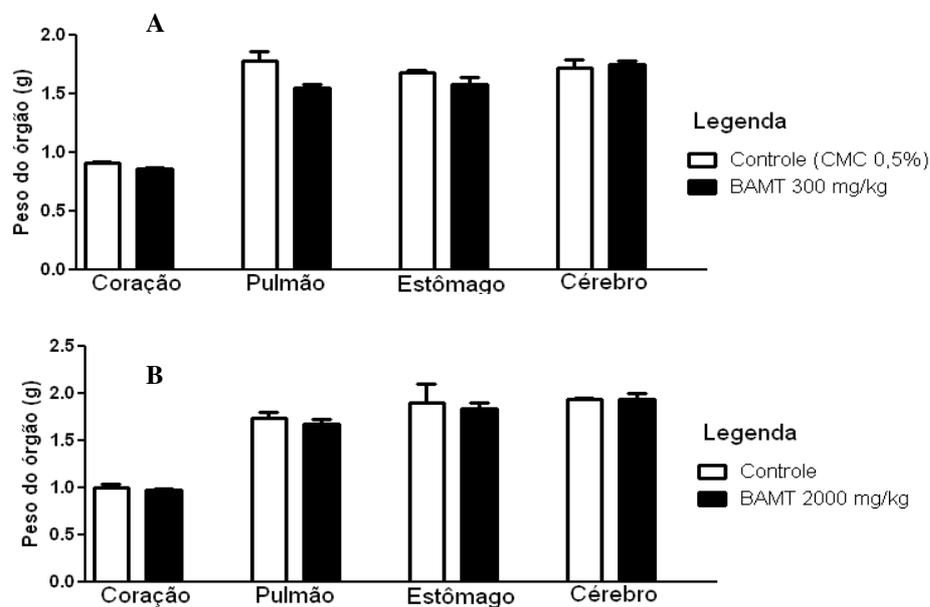


Figura 3.13 - Peso dos órgãos coração, pulmão, estômago e cérebro no tratamento com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> (A) e de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (B).

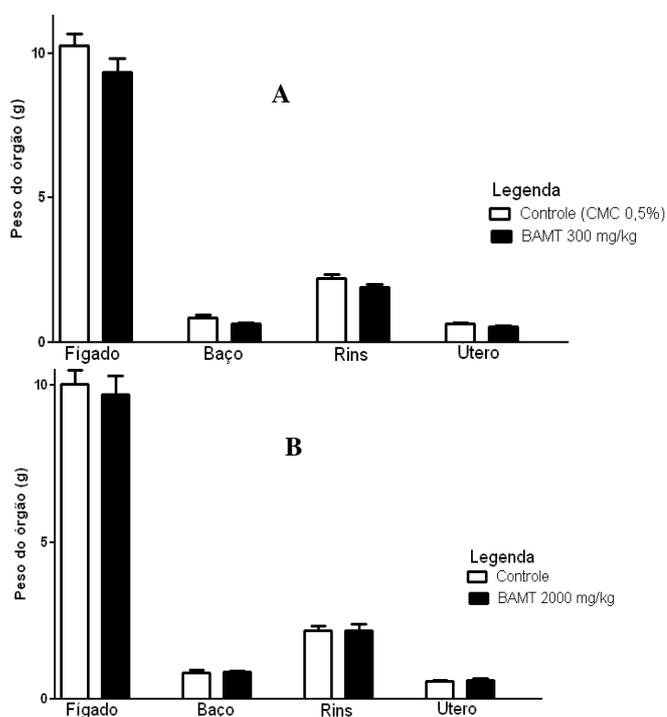


Figura 3.14 - Peso dos órgãos fígado, baço, rins e útero no tratamento com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> (A) e de 2000 mg kg<sup>-1</sup> (B).

Dessa forma, HAc3mT (BAMT) é classificado como um composto de categoria 5, ou seja, toxicidade letal aguda maior que  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$ , possuindo baixa toxicidade oral em dose única. Futuros testes de biodisponibilidade oral e de capacidade em atravessar a barreira hemato-encefálica deverão ser realizados de modo a complementar esse teste. O valor calculado de  $\log P = 3,87 \pm 0,58$  sugere que o composto apresenta lipofilia adequada para chegar ao cérebro ( $1,5 < \log P < 5,0$ ).<sup>11</sup>

## ***Complexos de zinco(II) de acetofenona- e benzofenona- tiossemicarbazonas: uso de tiossemicarbazonas para remoção de zinco(II) em doenças neurodegenerativas***

Zinco(II) é um íon essencial devido à sua presença em várias metaloenzimas. Zinco(II) pode adotar números de coordenação 4, 5 ou 6. Complexos mononucleares de zinco servem como modelos de enzimas de zinco tais como a fosfolipase C, ATPase e anidrase carbônica<sup>1</sup>. A atividade biológica de complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas tem sido bastante investigada ao longo dos anos.<sup>2</sup>

Considerando-se o amplo perfil farmacológico das tiossemicarbazonas e os múltiplos papéis de zinco(II) nos meios biológicos, complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona foram preparados com o objetivo de avaliar a atividade biológica desses compostos, já que o zinco pode também atuar como um bom carreador desses ligantes em meios fisiológicos.<sup>3</sup>

No capítulo 3 demonstramos que as tiossemicarbazonas bidentadas derivadas de acetofenona e benzofenona apresentam baixa toxidez. A inserção de grupos como haletos ou toluil em *N*(3) dá origem a compostos com lipofilia adequada para atravessar a membrana hematoencefálica. Assim, neste capítulo estudamos interações entre essas tiossemicarbazonas e zinco(II) para avaliarmos a possibilidade de usar os ligantes como agentes quelantes para remoção de zinco(II) de cérebros de pacientes com doenças neurodegenerativas.

### ***4.1- Caracterização dos complexos de zinco(II) de *N*(3)-*m*-clorofenil-, *N*(3)-*m*-flúorfenil-, *N*(3)-*m*-nitrofenil- e *N*(3)-*m*-toluil- acetofenona- e benzofenona-, tiossemicarbazonas***

Complexos de zinco(II) foram sintetizados conforme procedimento descrito no capítulo 2 (secção 2.4.2). A caracterização dos compostos foi feita a partir de análise elementar, temperaturas de fusão, medidas de condutividade molar e seus espectros eletrônicos, no infravermelho e de ressonância nuclear magnética. A Tabela 4.1.1 apresenta os rendimentos das reações assim como as cores, massas molares, análise elementar e condutividades molares dos complexos obtidos.

#### ***4.1.1- Análises dos complexos de zinco(II)***

##### ***Microanálises, massas molares e condutividade molar***

Os resultados das análises sugerem a formação de complexos do tipo  $[Zn(L)_2]$ , onde as tiossemicarbazonas encontram-se na forma aniônica, como mostra a figura 4.1.

<sup>1</sup> E.B. Seena, Prathapachandra K. Spectrochim. Acta Part A 69 (2008) 726.

<sup>2</sup> N.C. Kasuga, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, S. Nakano, N. Shimada, C. Koumo, K. Nomiya, J. Inorg. Biochem. 96 (2003) 298.

<sup>3</sup> T.P. Stanojkovic, D. Kovala-Demertzi, A. Primikyri, I. Garcia-Santos, A. Castineiras, Z. Juranic, M.A. Demertzis, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 467.

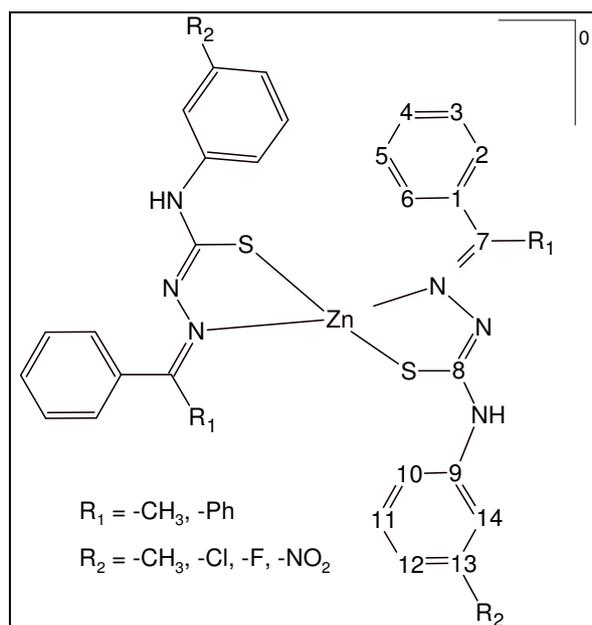


Figura 4.1- Estrutura geral para os complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona.

Tabela 4.1.1 – Cores, rendimentos de reações (Rend.), massas molares (MM), condutividade molar ( $\Lambda_M$ ), análise elementar e temperaturas de fusão para os complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona

Composto	Cor	Rend. (%)	MM (g mol <sup>-1</sup> )	$\Lambda_M^a$	Análise Elementar (%) <sup>b</sup>			Temp. fusão <sup>c</sup> °C	
					C	H	N		
1	[Zn(Ac3mT) <sub>2</sub> ]	Bege	60	630,16	1,36	59,98 (60,99)	4,68 (5,12)	13,89 (13,34)	176-180 (154-156)
2	[Zn(Bz3mT) <sub>2</sub> ]	Amarela	50	754,30	0,27	67,25 (66,88)	4,41 (4,81)	11,50 (11,14)	229-232 (160-161)
3	[Zn(Ac3mCl) <sub>2</sub> ]	Bege	74	671,0	0,44	53,87 (53,70)	3,80 (3,91)	12,72 (12,52)	213-214 (135-137)
4	[Zn(Bz3mCl) <sub>2</sub> ]	Amarela	70	795,13	0,09	60,14 (60,42)	3,80 (3,81)	10,57 (10,54)	201-209 (122-123)
5	[Zn(Ac3mF) <sub>2</sub> ]	Amarela	73	638,09	0,18	56,44 (56,47)	4,00 (4,11)	13,27 (13,17)	194-196 (162-165)
6	[Zn(Bz3mF) <sub>2</sub> ]	Amarela	74	762,23	0,35	62,83 (63,03)	3,76 (3,97)	11,28 (11,03)	229-230 (136-138)
7	[Zn(Ac3mNO <sub>2</sub> )]·H <sub>2</sub> O	Amarela	63	710,12	0,09	50,67 (50,74)	3,86 (3,97)	15,56 (15,78)	244-246 (135-137)
8	[Zn(Bz3mNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	Amarela	77	816,24	1,18	58,71 (58,86)	3,89 (3,70)	13,73 (13,73)	154-189 (141-144)

<sup>a</sup> $\Lambda_M$ : ( $\Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$ ) DMF~ $1,0 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ ; <sup>b</sup>Valores teóricos entre parênteses; <sup>c</sup>Pontos de fusão das tiossemicarbazonas entre parênteses.

Os resultados sugerem a formação de complexos neutros de zinco(II) do tipo  $[M(L)_2]$ .

### Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona mostram uma absorção na região 307-310 nm enquanto que as derivadas de benzofenona exibem uma banda em 318-319 nm. Essa absorção foi atribuída às transições  $\pi-\pi$  do anel aromático e às transições  $n-\pi$  das funções azometina e tioamida, superpostas em um mesmo envelope <sup>4,5</sup>. Nos espectros dos complexos de zinco(II) duas absorções foram observadas em 296-321 nm e 325-334 nm para as tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e em 320-335 nm e 360-366 nm para aquelas derivadas de benzofenona. A primeira foi atribuída à transição  $\pi-\pi$  do anel aromático e a segunda às transições  $n-\pi$  de C=N e C=S<sup>1</sup>. As duas absorções aparecem separadas nos espectros dos complexos devido à formação, após a desprotonação de N(2)-H, de um sistema altamente deslocalizado envolvendo o anel aromático e a cadeia N-N-C-S-N da tiossemicarbazona. Portanto, as transições  $n-\pi$  aparecem em regiões de mais baixa energia nos espectros dos complexos. A figura 4.2 apresenta os espectros eletrônicos da tiossemicarbazona HAc3mCl e seu complexo [Zn(Ac3mCl)<sub>2</sub>] (3).

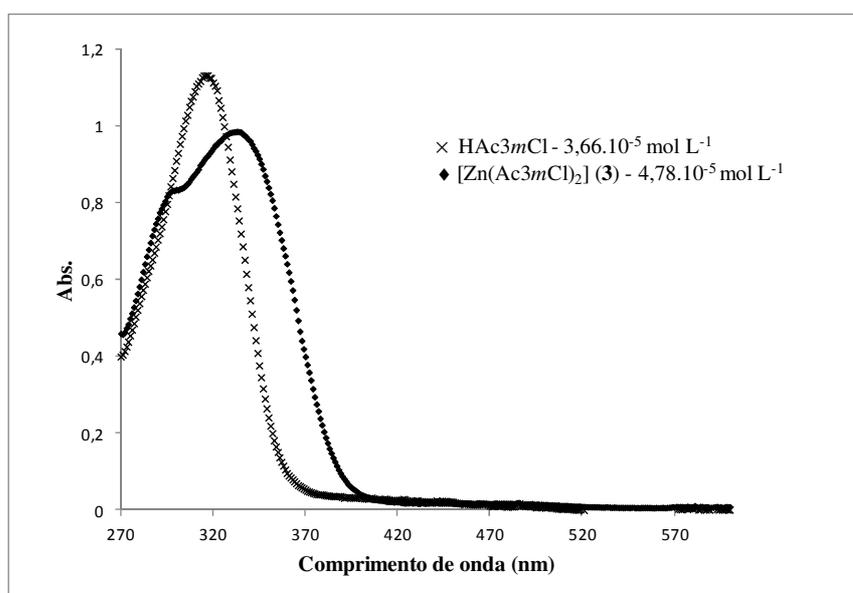


Figura 4.2 - Espectros eletrônicos de HAc3mCl e seu complexo [Zn(Ac3mCl)<sub>2</sub>] (3).

### Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho dos complexos foram comparados com os das bases livres a fim de se verificar o modo de coordenação ao centro metálico. A tabela 4.1.2 mostra as atribuições das bandas de cada composto.

Nos espectros das tiossemicarbazonas livres absorções na região 3342-3277 cm<sup>-1</sup> foram atribuídas às vibrações  $\nu$ (N-H). A ausência da banda característica do estiramento  $\nu$ (N2-H) nos

<sup>4</sup> H. Beraldo, W.F. Nacif, L.R. Teixeira, J.S. Rebouças, Transition Met. Chem. 27 (2002) 85.

<sup>5</sup> H. Beraldo, R. Lima, L.R. Teixeira, A.A. Moura, D.X. West, J. Mol. Struct. 559 (2001) 99.

espectros dos complexos está de acordo com a coordenação das tiossemicarbazonas sob a forma aniônica.<sup>2,6</sup>

A banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , que aparece na região entre 1588-1520  $\text{cm}^{-1}$  nas bases livres (Tabela 3.2.1), desloca-se para 1500-1474  $\text{cm}^{-1}$  nos complexos, indicando a coordenação através do nitrogênio imínico<sup>7</sup>. Também se pode observar um deslocamento da banda de estiramento  $\nu(\text{C}=\text{S})$  dos complexos em relação às bases, passando da região entre 804-764  $\text{cm}^{-1}$  nas tiossemicarbazonas para 777-749  $\text{cm}^{-1}$  nos complexos, indicando a coordenação através do átomo de enxofre na forma de tiolato.<sup>8,9</sup>

Outras bandas surgem nos espectros dos complexos, na região 424-349  $\text{cm}^{-1}$ , características dos estiramentos entre o metal e os átomos de enxofre e o nitrogênio azometínico que são:  $\nu(\text{Zn}-\text{N})$  em 424-418  $\text{cm}^{-1}$  e  $\nu(\text{Zn}-\text{S})$  em 390-349  $\text{cm}^{-1}$ <sup>9,10,11</sup>. As figuras 4.3 e 4.4 mostram os espectros para a tiossemicarbazona HBz3mT e seu complexo  $[\text{Zn}(\text{Bz3mT})_2]$  (**2**) nas regiões de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  e 700-200  $\text{cm}^{-1}$ .

---

<sup>6</sup> D.X. West, A. Castineiras, E. Bermejo, J. Mol. Struct. 520 (2000) 103.

<sup>7</sup> D.X. West, I.S. Billeh, J.P. Jasinski, J.M. Jasinski, R.J. Butcher, Transition Met. Chem. 23 (1998) 209.

<sup>8</sup> J.G. Da Silva, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, J. Coord. Chem. 62 (2009) 1400.

<sup>9</sup> K. Alomar, A. Landreau, M. Kempf, M.A. Khan, M. Allain, G. Bouet, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 397.

<sup>10</sup> A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, J. Mol. Struct. 920 (2009) 97.

<sup>11</sup> G.L. Parrilha, R.P. Vieira, A.P. Rebolledo, I.C. Mendes, L.M. Lima, E.J. Barreiro, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Polyhedron 30 (2011) 1891.

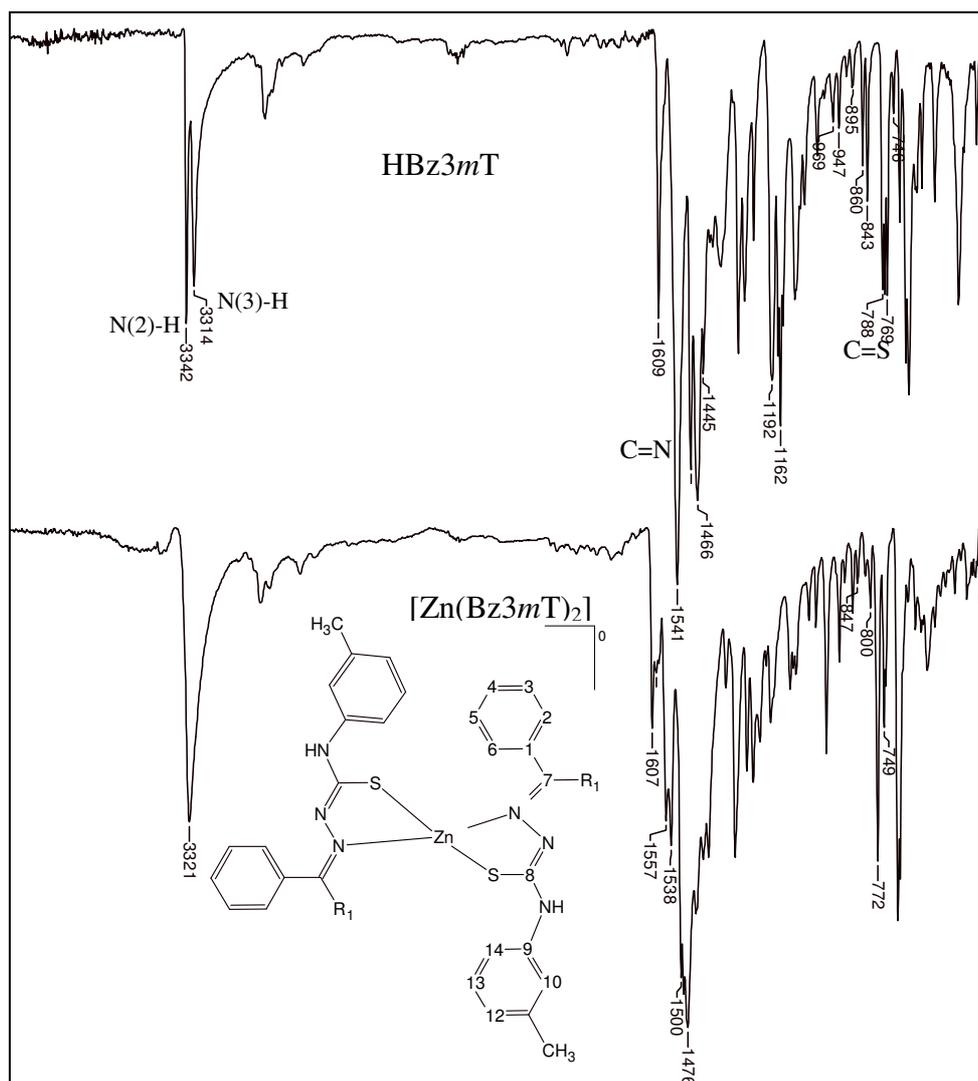


Figura 4.3 – Espectro no infravermelho de HBz3mT e seu complexo [Zn(Bz3mT)<sub>2</sub>] (2) na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, em pastilha de KBr.

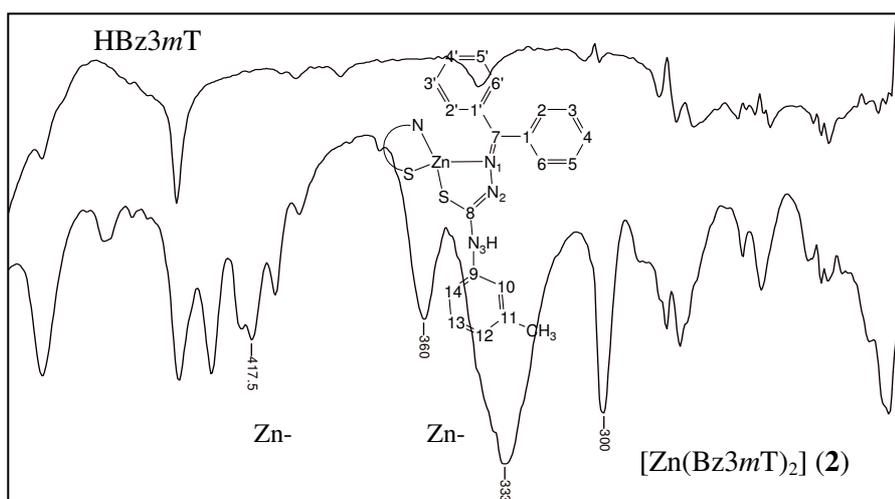


Figura 4.4 – Espectro no infravermelho de HBz3mT e seu complexo [Zn(Bz3mT)<sub>2</sub>] (2) região de 500-200 cm<sup>-1</sup>, suporte CsI/nujol.

Tabela 4.1.2 - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona e seus complexos de zinco(II)

Composto	$\nu(\text{N3-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=S})$	$\nu(\text{Zn-N})$	$\nu(\text{Zn-S})$
<b>HAc3mT</b>	<b>3303F</b>	<b>1521F</b>	<b>798m</b>	-	-
[Zn(Ac3mT) <sub>2</sub> ] (1)	3413m	1490 F	774m	424m	374m
<b>HBz3mT</b>	<b>3342F</b>	<b>1541F</b>	<b>788m</b>	-	-
[Zn(Bz3mT) <sub>2</sub> ] (2)	3321m	1500F	749m	418m	360m
<b>HAc3mCl</b>	<b>3295F</b>	<b>1520F</b>	<b>793m</b>	-	-
[Zn(Ac3mCl) <sub>2</sub> ] (3)	3414m	1490F	762m	423m	367m
<b>HBz3mCl</b>	<b>3342F</b>	<b>1588F</b>	<b>804m</b>	-	-
[Zn(Bz3mCl) <sub>2</sub> ] (4)	3320m	1481F	777m	420m	349m
<b>HAc3mF</b>	<b>3299F</b>	<b>1520F</b>	<b>787m</b>	-	-
[Zn(Ac3mF) <sub>2</sub> ] (5)	3330m	1500F	756m	418m	349m
<b>HBz3mF</b>	<b>3302F</b>	<b>1546F</b>	<b>780m</b>	-	-
[Zn(Bz3mF) <sub>2</sub> ] (6)	3318m	1481F	755m	419m	349m
<b>HAc3mNO<sub>2</sub></b>	<b>3277F</b>	<b>1531F</b>	<b>764m</b>	-	-
[Zn(HAc3mNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] (7)	3373m	1481F	759m	419m	390m
<b>HBz3mNO<sub>2</sub></b>	<b>3340F</b>	<b>1543F</b>	<b>790m</b>	-	-
[Zn(Bz3mNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] (8)	3342m	1474F	770m	419m	354m

\* F = forte, m = média, f = fraca.

*Ressonância Magnética Nuclear*

As atribuições dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 das tiossemicarbazonas e seus complexos de zinco(II) encontram-se nas tabelas 4.1.3 a 4.1.6. As posições posição dos sinais de  $^1\text{H}$  dos complexos são muito próximos para as duas tiossemicarbazonas coordenadas, permitindo a visualização de um único sinal para cada próton. A ausência do sinal de hidrogênio do N(2)-H nos espectros de todos os complexos confirma que as tiossemicarbazonas encontram-se em sua forma aniônica, conforme foi proposto a partir dos dados analíticos e espectros no infravermelho. Nos espectros de todos os complexos observa-se o deslocamento dos sinais de hidrogênio principalmente os de N(3)-H em relação aos correspondentes nas tiossemicarbazonas livres, indicando a coordenação através do átomo de enxofre. Também se observa um descolamento significativo no sinal do grupo acetil das tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona, que indica a coordenação através do nitrogênio imínico. As figuras 4.5 e 4.6 mostram os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para HAc3mF e HBz3mF e seus complexos [Zn(Ac3mF)<sub>2</sub>] (5) e [Zn(Bz3mF)<sub>2</sub>] (6).

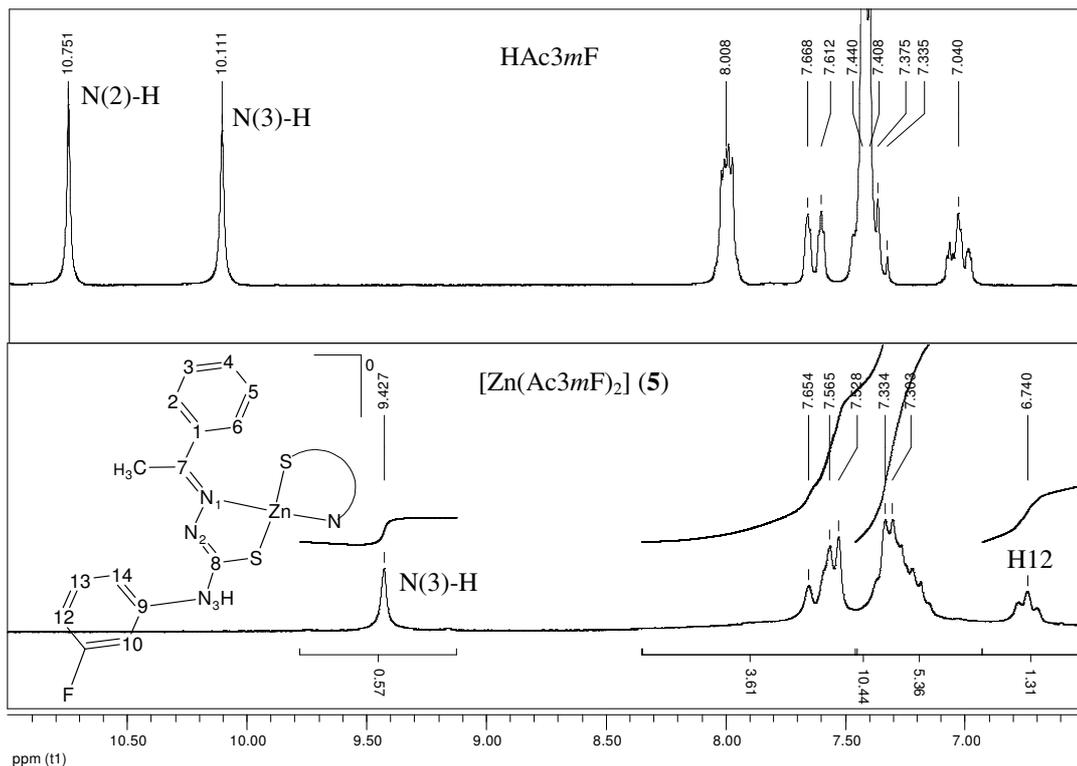


Figura 4.5 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  entre 11-6,5 ppm de  $\text{HAc3mF}$  e seu complexo  $[\text{Zn}(\text{Ac3mF})_2]$  (5) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

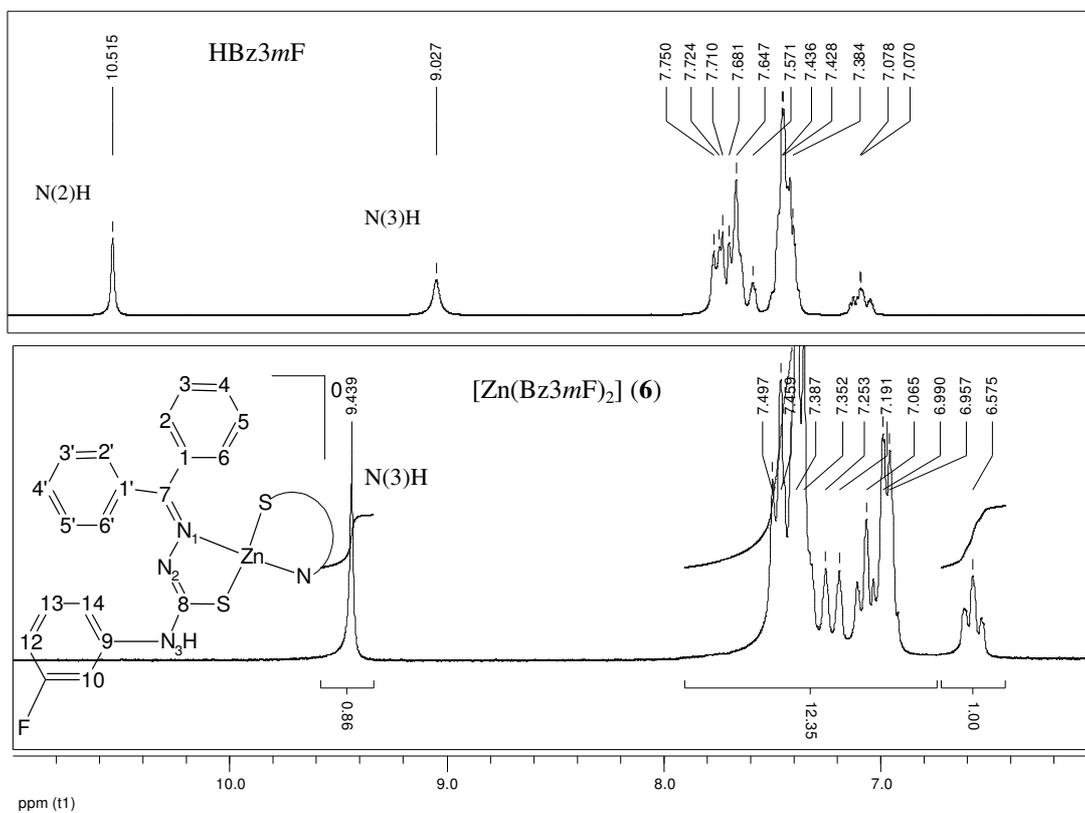
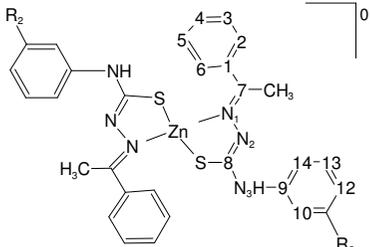


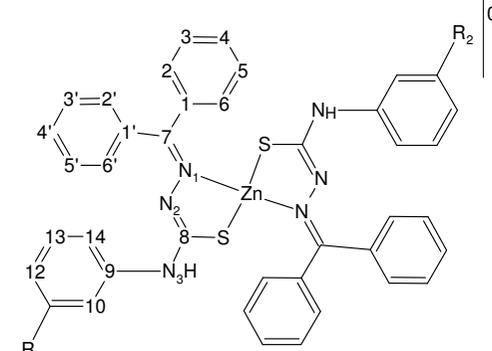
Figura 4.6 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  entre 11-6 ppm de  $\text{HBz3mF}$  e seu complexo  $[\text{Zn}(\text{Bz3mF})_2]$  (6) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

Tabela 4.1.3 - Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), constante de acoplamento ( $J$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas acetofenona (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

Composto									
	H2, H6 (d) 1	H3, H4 e H5 (t) 1	N(2)H (s) 1	N(3)H (s) 1	H10 (s) 1	H12* (d) 1	H13* (t) 1	H14* (d) 1	CH3 (acetil)
HAc3mT	8,03-7,98; $^1J = 6,26/ 6,79$ $^2J = 2,75/ 3,28$	7,43-7,38	9,98	10,57	7,43-7,38	7,04-7,01 $^1J = 7,35$	7,25 $^1J = 7,63$	7,43-7,38	2,32
[Zn(Ac3mT) <sub>2</sub> ] (1)	7,39-7,20	7,55-7,51	-	9,01	7,39-7,20	6,75	7,12	7,55-7,51	2,26
HAc3mCl	8,04-7,99; $^1J = 6,01$ $^2J = 3,26$	7,43-7,39	10,78	10,12	7,78	7,28-7,24; $^1J = 8,07$	7,43-7,39; $^1J = 8,07$	7,60-7,56	3,39
[Zn(Ac3mCl) <sub>2</sub> ] (3)	7,57-7,53; $^1J = 7,25$	7,34-7,14	-	9,42	7,87	6,99-6,95; $^1J = 7,57$	7,34-7,14	7,53-7,44; $^1J = 8,31$	2,25
HAc3mF	8,03-7,98; $^1J = 6,17$ $^2J = 2,73$	7,44-7,33	10,75	10,11	7,67-7,61	7,44-7,33; $^1J = 11,15$ $^2J = 2,23$	7,04	7,64	2,39
[Zn(Ac3mF) <sub>2</sub> ] (5)	7,65-7,53	7,33-7,19	-	9,43	7,65	6,74	7,33-7,19; $^1J = 8,04$	7,33-7,19; $^1J = 12,49$	2,26
HAc3mNO <sub>2</sub>	8,11-8,03	7,43	10,93	10,33	8,65	8,11-8,03	7,64; $^1J = 8,13$	8,11-8,03	2,41
[Zn(Ac3mNO <sub>2</sub> )] (7)	7,60-7,50; $^1J = 7,31$	7,60-7,54	-	9,75	8,84	7,82-7,79; $^1J = 7,85$	7,60-7,54; $^1J = 7,31$	7,82-7,79	2,33

\*Desdobramento padrão; no entanto, devido à sobreposição de sinais são apenas observados multipletos.

Tabela 4.1.4 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) e multiplicidade (M) dos principais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  de complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

Composto										
	H2, H6 (d)* 1	H3, H5 (t)* 1	H4 (t)* 1	N(2)H (s) 1	N(3)H (s) 1	H10 (s)* 1	H12 (d) 1	H13 (t) 1	H14 (d) 1	
<b>HBz3mT</b>	<b>7,76-7,72</b>	<b>7,43-7,37</b>	<b>7,76-7,72</b>	<b>10,39</b>	<b>8,81</b>	<b>7,37</b>	<b>7,08-7,04</b> $^1J = 7,26$	<b>7,27</b> $^1J = 7,56$	<b>7,43-7,37</b>	
[Zn(Bz3mT) <sub>2</sub> ] (2)	7,43-7,25	7,43-7,25	7,43-7,25	-	9,16	7,25	6,62-6,58	6,85	6,99-6,96	
<b>HBz3mCl</b>	<b>7,74-7,65</b>	<b>7,45-7,37</b>	<b>7,74-7,65</b>	<b>10,50</b>	<b>9,01</b>	<b>7,74-7,65</b>	<b>7,31-7,27;</b> $^1J = 7,29$	<b>7,45-7,37;</b> $^1J = 7,92$	<b>7,60-7,56</b>	
[Zn(Bz3mCl) <sub>2</sub> ] (4)	6,81	6,99-6,92	6,99-6,92	-	9,42	7,50-7,45	6,82; $^1J = 8,03$	7,50-7,45; $^1J = 8,42$	7,24	
<b>HBz3mF</b>	<b>7,75-7,71</b>	<b>7,43-7,39</b>	<b>7,75-7,71</b>	<b>10,52</b>	<b>9,03</b>	<b>7,58</b>	<b>7,68-7,65</b>	<b>7,68-7,65;</b> $^1J = 6,08$	<b>7,07</b>	
[Zn(Bz3mF) <sub>2</sub> ] (6)	7,50-7,47; $^1J = 6,69$	7,40-7,36	6,99-6,97	-	9,44	7,25-7,19	6,99-6,96; $^1J = 7,96$	6,58; $^1J = 8,04$	7,07	
<b>HBz3mNO<sub>2</sub></b>	<b>8,09</b>	<b>7,71-7,66</b>	<b>8,09</b>	<b>10,72</b>	<b>9,25</b>	<b>8,62</b>	<b>7,71-7,66</b>	<b>7,43</b>	<b>8,09</b>	
[Zn(Bz3mNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] (8)	7,00-6,97	7,51-7,48; $^1J = 7,52$	7,00-6,97	-	9,73	8,22	7,74-7,69; $^1J = 8,69$	7,16	7,67-7,62; $^1J = 9,02$	

\*Desdobramento padrão; no entanto, devido à sobreposição de sinais são apenas observados multipletos.

Nas tabelas 4.1.5 e 4.1.6 estão as atribuições dos principais sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 para os complexos de zinco(II) de *N*(3)-*m*-clorofenil-, *N*(3)-*m*-flúorfenil- e *N*(3)-*m*-nitrofenil-acetofenona- tiossemicarbazonas. As posições dos sinais de carbono são ligeiramente diferentes para as duas tiossemicarbazonas coordenadas ao metal, resultando em sinais duplicados para a maioria dos complexos. Os sinais das tiossemicarbazonas sofrem deslocamentos significativos após a coordenação ao zinco(II), principalmente os sinais dos carbonos C2, C7, C8 e C9 reforçando a proposta na qual a tiossemicarbazona coordena-se ao metal através do nitrogênio imínico e do enxofre na forma de tiolato. Esses resultados estão coerentes com os obtidos a partir dos espectros no infravermelho. Na figura 4.7 encontram-se os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HBz3mF e seu complexo  $[\text{Zn}(\text{Bz3mF})_2]$  (**6**).

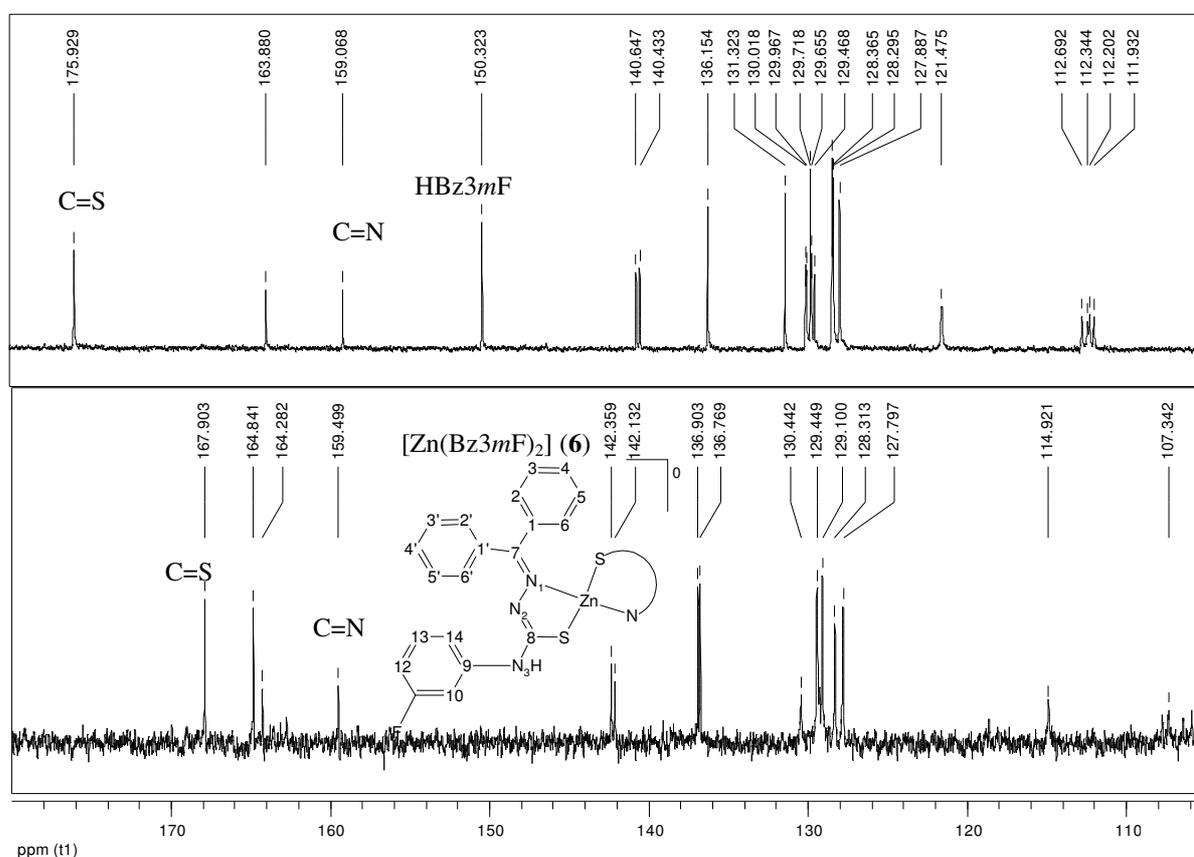


Figura 4.7 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HBz3mF e seu complexo  $[\text{Zn}(\text{Bz3mF})_2]$  (**6**) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

Tabela 4.1.5 - Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) dos principais sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 dos complexos de zinco(II) de tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

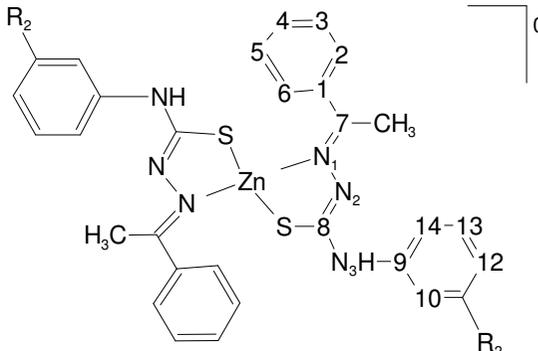
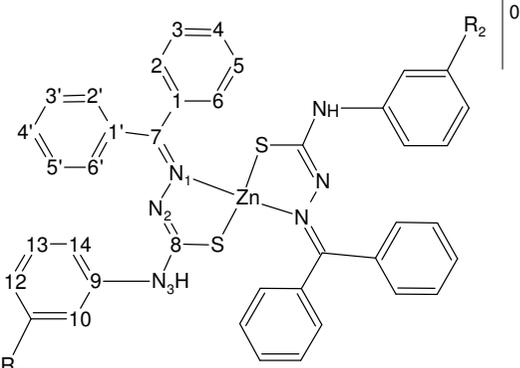
									
Composto	C8	C7	C1	C9	C10	C11	C2,C6	C3,C5	C <sub>(acetil)</sub>
DEPT	-	-	-	-	↑	-	↑	↑	↑
<b>HAc3mT</b>	<b>176,84</b>	<b>148,81</b>	<b>138,94</b>	<b>137,42</b>	<b>122,83</b>	<b>137,28</b>	<b>126,76</b>	<b>128,19</b>	<b>14,34</b>
[Zn(Ac3mT) <sub>2</sub> ] (1)	169,21	148,49	137,11	140,29	122,21	143,48	127,16	128,92	21,26
<b>HAc3mCl</b>	<b>176,83</b>	<b>137,32</b>	<b>132,08</b>	<b>140,58</b>	<b>125,11</b>	<b>149,51</b>	<b>126,85</b>	<b>128,19</b>	<b>14,49</b>
[Zn(Ac3mCl) <sub>2</sub> ] (3)	167,05	137,30	132,61	142,33	120,81	166,11	127,34	128,16	21,18
<b>HAc3mF</b>	<b>176,71</b>	<b>150,39</b>	<b>136,14</b>	<b>140,90-140,68</b>	<b>112,36-111,86</b>	<b>163,84-159,04</b>	<b>126,82</b>	<b>128,19</b>	<b>14,48</b>
[Zn(Ac3mF) <sub>2</sub> ] (5)	167,11	159,64	137,30	142,82-142,59	106,75-106,22	166,32-166,08	127,34	128,19	21,25
<b>HAc3mNO<sub>2</sub></b>	<b>176,97</b>	<b>147,19</b>	<b>137,28</b>	<b>140,34</b>	<b>131,98</b>	<b>150,14</b>	<b>126,92</b>	<b>128,21</b>	<b>14,59</b>
[Zn(Ac3mNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] (7)	167,16	147,79	137,36	141,92	129,97	147,94	127,36	128,17	21,32

Tabela 4.1.6 - Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) dos principais sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 dos complexos de tiossemicarbazonas derivadas de benzofenona (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

		Atribuições						
Composto	C8	C7	C1	C9	C10	C11	C2,C6	C3,C5
DEPT	-	-	-	-	↑	-	↑	↑
<b>HBz3mT</b>	<b>175,94</b>	<b>149,67</b>	<b>138,68</b>	<b>137,39</b>	<b>123,00</b>	<b>136,15</b>	<b>129,83</b>	<b>128,26</b>
[Zn(Bz3mT) <sub>2</sub> ] (2)	167,98	163,63	137,15	140,68	119,86	137,05	129,55	127,66
<b>HBz3mCl</b>	<b>176,01</b>	<b>150,39</b>	<b>132,18</b>	<b>140,31</b>	<b>130,03</b>	<b>136,14</b>	<b>128,37</b>	<b>129,73</b>
[Zn(Bz3mCl) <sub>2</sub> ] (4)	168,06	141,94	132,63	136,90	120,94	136,67	129,27	129,49
<b>HBz3mF</b>	<b>175,93</b>	<b>150,32</b>	<b>136,15</b>	<b>140,65-140,43</b>	<b>112,34-112,20</b>	<b>163,88-159,07</b>	<b>127,62</b>	<b>128,37</b>
[Zn(Bz3mF) <sub>2</sub> ] (6)	167,90	136,90	136,77	142,36-142,13	105,94-105,91	159,50	128,31	129,45
<b>HBz3mNO<sub>2</sub></b>	<b>176,15</b>	<b>147,24</b>	<b>136,17</b>	<b>140,07</b>	<b>131,95</b>	<b>150,98</b>	<b>127,95</b>	<b>129,66</b>
[Zn(Bz3mNO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] (8)	168,27	147,73	136,83	141,50	130,53	165,34	129,40	129,48

## 4.2 – Cristalografia por Difração de Raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos  $[\text{Zn}(\text{Ac}3m\text{Cl})_2]$  (**3**) e  $[\text{Zn}(\text{Bz}3m\text{F})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**6a**) foram determinadas. Os cristais foram obtidos por difusão lenta em uma solução de DMSO/acetona. Para as determinações estruturais foi utilizado um difratômetro GEMINI-Ultra.<sup>12</sup>

Os resumos da coleção de dados e do refinamento<sup>5,13,14,15</sup> das estruturas estão dispostos na Tabela 4.2.1. As estruturas determinadas para os compostos estão apresentadas na figura 4.8 e as distâncias e ângulos de ligação na tabela 4.2.2.

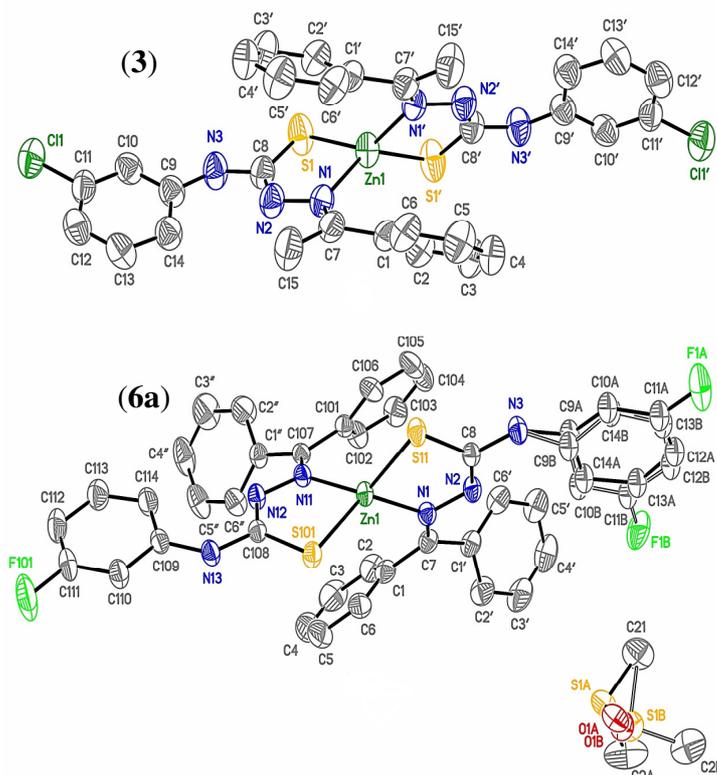


Figura 4.8 – Diagrama molecular de  $[\text{Zn}(\text{Ac}3m\text{Cl})_2]$  (**3**) e de  $[\text{Zn}(\text{Bz}3m\text{F})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**6a**).

Os dados cristalográficos indicam que os complexos  $[\text{Zn}(\text{Ac}3m\text{Cl})_2]$  (**3**) e  $[\text{Zn}(\text{Bz}3m\text{F})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**6a**) são moléculas neutras formadas por um centro metálico de zinco(II) coordenado a duas tiossemicarbazonas aniônicas através do sistema quelante N–S (ver figura 4.8).

A unidade assimétrica do complexo (**3**) contém meia molécula de  $[\text{Zn}(\text{Ac}3m\text{Cl})_2]$ . No complexo (**6a**) um dos grupos *meta*-flúorfenil e a molécula de DMSO mostram dois tipos de desordem independentes. A estrutura de **6a** poderia apresentar maior simetria na ausência da molécula de DMSO

<sup>12</sup> CRYSLISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.34.34 (release 05-01-2010CrysAlis171.NET).

<sup>13</sup> Pacote do Siemens.

<sup>14</sup> G.M. Sheldrick, SHELXS-97; Program for the Solution of Crystal Structures; University of Göttingen, Germany (1997). G. M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany (1997).

<sup>15</sup> L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst. 30 (1997) 565; L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst. 32 (1999) 837.

e da desordem no anel *meta*-flúorfenil. De fato, as distâncias e ângulos nos dois ligantes do complexo (**6a**) não são significativamente diferentes (ver tabela 4.2.2).

Tabela 4.2.1 - Resumo da coleção de dados e refinamento dos complexos [Zn(Ac3mCl)<sub>2</sub>] (**3**) e [Zn(Bz3mF)<sub>2</sub>].DMSO (**6a**)

Composto	( <b>3</b> )	( <b>6a</b> )
Fórmula empírica	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Zn	C <sub>42</sub> H <sub>36</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> OS <sub>3</sub> Zn
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	670,96	840,32
Cor	Amarelo	Amarelo
Dimensões do cristal (mm <sup>3</sup> )	0,39 x 0,21 x 0,13	0,92 x 0,33 x 0,10
Temperatura (K)	293(2)	250(2)
Radiação, λ (Å)	Cu <sub>Kα</sub> , 1,54184	Mo <sub>Kα</sub> , 0,71073
Intervalo de θ (°)	4,71 a 58,93	4,08 a 26,37
Intervalos de hkl	-21 ≤ h ≤ 21, -9 ≤ k ≤ 10, -19 ≤ l ≤ 14	-13 ≤ h ≤ 13, -14 ≤ k ≤ 14, -22 ≤ l ≤ 22
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, C 2/c	Triclínico, P $\bar{1}$
a (Å)	19,3896(16)	10,4751(2)
b (Å)	9,0743(5)	11,4047(2)
c (Å)	17,4434(14)	18,3352(4)
α (°)	90	79,654(2)
β (°)	104,534(8)	75,821(2)
γ (°)	90	71,934(2)
Volume (Å <sup>3</sup> )/Z	2970,9(4) / 4	2006,19(7) / 2
F(000)	1376	868
Densidade calculada (mg.m <sup>-3</sup> )	1,500	1,391
Coefficiente de absorção μ (mm <sup>-1</sup> )	4,371	0,819
Reflexões coletadas	9168	32790
Reflexões únicas/ R(int)	2132 / 0,0467	8170 / 0,0305
Restrições/ Parâmetros refinados	0 / 187	168 / 588
R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0416; wR2 = 0,1024	R1 = 0,0324; wR2 = 0,0839
R (all)	R1 = 0,0646; wR2 = 0,1180	R1 = 0,0458; wR2 = 0,0871
Qualidade de ajuste, S	1,051	1,039
Δρ min/max (e.Å <sup>3</sup> )	-0,273 / 0,252	-0,433 / 0,733

A geometria ao redor do metal em **3** e **6a** é um tetraedro altamente distorcido. Os menores ângulos N1-Zn1-S1 no complexo (**3**) e N1-Zn1-S11, N11-Zn1-S101 no complexo (**6a**) (86,5-87,5 °) são muito diferentes de 109 °, o ângulo de um tetraedro perfeito, provavelmente devido à rigidez do sistema quelante N-S das tiossemicarbazonas. A soma dos ângulos N1-Zn1-S1, N1-Zn1-S1', N1'-Zn1-S1', N1'-Zn1-S1 é de 442,7 ° para o complexo (**3**) e a soma dos ângulos equivalentes para o complexo (**6a**) é de 446,16 ° e 445,38 °, enquanto que a soma dos quatro ângulos de um tetraedro perfeito é de

437,88 °. Assim, como já mencionado, as geometrias dos complexos **(3)** e **(6a)** são um tetraedro altamente distorcido.

Nos complexos **(3)** e **(6a)** as tiossemicarbazonas encontram-se na conformação *EZ* em relação às ligações C7-N1 e N2-C8. Ao comparar os complexos **(3)** e **(6a)** observa-se que as distâncias de ligações são relativamente próximas. De uma forma geral, os ângulos da cadeia das tiossemicarbazonas nos dois complexos também são parecidos. No entanto, os ângulos formados com metal não são similares.

Apesar de o complexo **(3)** conter um átomo de cloro como substituinte no grupo *N*(3)-fenil e **(6a)** um átomo de flúor substituinte, as distâncias de ligação não são muito diferentes entre os complexos **(3)** e **(6a)**. Isso levaria a possíveis comparações entre HAc3*m*F (ver cap. 3) e o complexo [Zn(Ac3*m*Cl)<sub>2</sub>] (**3**). A ligação C8-S1, que apresenta um caráter predominantemente de dupla, varia de 1,670(2) Å a 1,738 (4) Å no complexo **(3)** como consequência da desprotonação, levando à formação de uma ligação com caráter predominantemente de simples<sup>16</sup>. A ligação N2-C8 de 1,354(2) Å em HAc3*m*F muda para 1,283(5) no complexo **(3)** devido ao mesmo efeito. Mudanças significativas foram observadas nos ângulos que envolvem o átomo de enxofre em HAc3*m*F e em **3**.

---

<sup>16</sup> K.S.O. Ferraz, L. Ferandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.F. Leite, E.M. Souza-Fagundes, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7138.

Tabela 4.2.2 - Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Zn(Ac3mCl)<sub>2</sub>] (3) e [Zn(Bz3mF)<sub>2</sub>]·DMSO (6). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	Distâncias (Å)		
	(3)	Átomos	(6)
Zn1-N1#1	2,075(3)	Zn1-N1	2,0533(14)
Zn1-N1	2,075(3)	Zn1-N11	2,0562(14)
Zn1-S1#1	2,2884(11)	Zn1-S2	2,2848(5)
Zn1-S1	2,2884(11)	Zn1-S3	2,2725(5)
S1-C8	1,738(4)	S3-C8	1,7517(17)
N1-C7	1,309(5)	N1-C7	1,303(2)
N1-N2	1,387(4)	N1-N2	1,390(2)
N2-C8	1,283(5)	N2-C8	1,298(2)
N3-C8	1,379(5)	N3-C8	1,370(2)
Átomos	Ângulos (°)		
	(3)	Átomos	(6)
N1#1-Zn1-N1	107,80(16)	N1-Zn1-N11	115,01(6)
S1#1-Zn1-S1	111,82(6)	S3-Zn1-S2	114,553(19)
N1#1-Zn1-S1#1	85,63(8)	N1-Zn1-S3	87,58(4)
N1-Zn1-S1#1	137,45(9)	N1-Zn1-S2	129,02(4)
N1#1-Zn1-S1	85,63(8)	N11-Zn1-S2	87,00(4)
N1-Zn1-S1	111,82(6)	N11-Zn1-S3	128,81(4)
C8-S1-Zn1	93,21(14)	C8-S3-Zn1	92,30(6)
C7-N1-N2	113,9(3)	C7-N1-N2	115,24(14)
N1-N2-C8	115,2(3)	N1-N2-C8	115,90(14)
N2-C8-S1	129,0(3)	N2-C8-S3	128,42(13)
S-C8-N3	113,1(3)	N3-C8-S3	113,63(13)
N3-C8-N2	117,9(4)	N3-C8-N2	117,95(16)
C8-N3-C9	130,3(3)	C8-N3-C9A	140,6(8)

Operações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: #1 -x,y,-z+1/2.

Alguns resultados aqui apresentados foram objeto do artigo intitulado *Structural studies on acetophenone- and benzophenone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) complexes*, recentemente publicado em *Journal of Molecular Structure* (K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. da Silva, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, *J. Mol. Struct.* 1008 (2012) 102 - ver Anexo).

### 4.3 - Atividade Biológica

Os ligantes e complexos de zinco(II) foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e fungos *Candida albicans*, mas revelaram-se inativos.

Uma vez que as tiossemicarbazonas livres não foram ativas ou foram fracamente ativas como agentes citotóxicos, e que têm grande afinidade pelo zinco(II) - e muito provavelmente por cobre(II) - poderiam constituir protótipos interessantes de agentes quelantes para a remoção de metais como zinco(II) e cobre(II) de cérebros de pacientes com o mal de Alzheimer.

## ***Investigação da atividade citotóxica e de mecanismos de ação de complexos de ouro(I, III) e platina(II, IV) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina***

O desenvolvimento de potentes agentes antineoplásicos, antibacterianos, antimaláricos e antivirais tem considerável interesse em química e biologia. O interesse em antitumorais de platina tem a sua origem com a descoberta casual de Barnett Rosenberg (1965), da inibição da divisão celular por complexos de platina<sup>1</sup>. Cisplatina, *cis*-(diaminodicloro)platina(II) (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) é um composto amplamente usado na clínica no tratamento de tumores. No entanto esse uso tem sido limitado devido ao desenvolvimento freqüente de resistência, aos efeitos colaterais graves e ao limitado espectro de atividade da cisplatina e dos derivados de segunda geração como carboplatina. Com isso, o interesse no desenvolvimento de análogos da cisplatina tem se intensificado ao longo dos anos para superar essas barreiras.<sup>2</sup>

A literatura descreve compostos de platina(II) monofuncionais (com apenas um cloreto como grupo abandonador) que foram ativos em baixas concentrações contra diversos tipos de células tumorais<sup>3</sup>. Compostos de platina(IV) têm se mostrado promissores no estudo de novos agentes antitumorais, pois são mais solúveis em água, e muito provavelmente serão usados na clínica no futuro. Acredita-se que os complexos de platina(IV) manifestem sua atividade biológica depois de sofrerem redução à platina(II) dentro do organismo provocando lesões celulares após ligarem-se ao ADN<sup>4</sup>. O estudo da ação citotóxica de complexos de platina(IV) de tiossemicarbazonas constitui uma novidade nessa área.

Complexos de ouro(I) de *bis*(difosfinas), tal como [Au(dppe)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (dppe = 1,2-difenilfosfinoetano), são ativos contra vários tipos de câncer<sup>5</sup>. Complexos de ouro(III) são isoeletrônicos (5d<sup>8</sup>) e isoestruturais (quadráticos) com os de platina(II) e a literatura relata que esses compostos também exibem atividade antitumoral<sup>6</sup>. Em um trabalho recente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a complexação de tiossemicarbazonas com ouro(I) resultou em compostos altamente ativos contra células de tumores sólidos e leucemias.<sup>7</sup>

No presente trabalho procuramos dar continuidade a essa investigação através da obtenção de complexos de platina(II, IV) e ouro(I, III) com famílias de tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.

<sup>1</sup> A.K. Mishra, N.K. Kaushik, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 1239.

<sup>2</sup> A.I. Matesanz, P. Souza, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 245.

<sup>3</sup> X. Wanga, Z. Guo, Dalton Trans., (2008) 1521.

<sup>4</sup> A.P.S. Fontes, S.G. Almeida, L.A. Nader, Quím. Nova 4 (1997) 20.

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

<sup>6</sup> W. Henderson, B.K. Nicholson, S.J. Faville, D. Fan, J.D. Ranford, J. Organometal. Chem. 631 (2001) 41.

<sup>7</sup> J.A. Lessa, J.C. Guerra, L.F. de Miranda, C.F.D. Romeiro, J.G. Da Silva, I.C. Mendes, N.L. Speziali, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1729.

As *N*(4)-toluol tiossemicarbazonas livres foram caracterizadas anteriormente por outros pesquisadores de nosso grupo<sup>8</sup>. A notação empregada será a seguinte: *N*(4)-*para* toluil 2-formilpiridina tiossemicarbazona: H2Fo4*p*T; *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas: H2Ac4*o*T, H2Ac4*m*T, H2Ac4*p*T; *N*(4)-*para* toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona: H2Bz4*p*T.

Essas tiossemicarbazonas apresentam-se na configuração *Z* ou *E* em relação à ligação C7=N2, conforme a figura 5.1. No isômero *Z* a parte formada por N3-CS-N4 aparece na posição *cis* com relação à piridina, facilitando a formação de ligação de hidrogênio entre N3-H e o nitrogênio heteroaromático. No isômero *E*, a piridina encontra-se em posição *trans* ao grupo N3-CS-N4 e, portanto não há a formação de ligação de hidrogênio intramolecular.

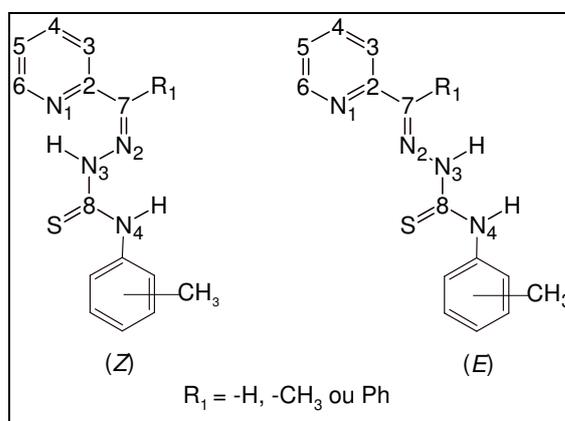


Figura 5.1 – Isômeros configuracionais *Z* e *E* de tiossemicarbazonas derivadas de piridina.

### 5.1- Complexos de ouro(I, III) de *N*(4)-*para* toluil 2-formilpiridina tiossemicarbazona-, *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil 2-acetilpiridina- tiossemicarbazona e de *N*(4)-*para* toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona

#### 5.1.1 - Análises dos complexos de ouro(I, III)

Os compostos foram caracterizados por temperaturas de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar (ver Tabela 5.1.1) e por seus espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Os complexos (3) e (5) também foram caracterizados por termogravimetria. Foram obtidos espectros de massas para os complexos (2), (4) e (5).

<sup>8</sup> I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571.

Tabela 5.1.1 - Dados analíticos obtidos para complexos de ouro(I, III) das tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina

Composto	Cor	MM (g mol <sup>-1</sup> )	$\Lambda_M^a$	Análise Elementar (%) <sup>b</sup>			Temp. fusão <sup>c</sup> °C	
				C	H	N		
				<b>1</b>	[Au(H <sub>py</sub> 2Fo4pT)Cl]	Castanha clara	502,77	17
<b>2</b>	[Au(2Ac4oT)Cl][AuCl <sub>2</sub> ]	Castanha	783,66	51	23,29 (22,99)	1,80 (1,93)	7,22 (7,15)	dec.>180 (162-163)
<b>3</b>	Au(H <sub>py</sub> 2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> Cl·H <sub>2</sub> O	Castanha	605,72	60	29,98 (29,74)	2,78 (3,00)	9,21 (9,25)	>300 (139-140)
<b>4</b>	[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl	Castanha	587,71	50	30,30 (30,65)	2,73 (2,74)	9,55 (9,53)	177-179 (154-156)
<b>5</b>	[Au(H <sub>py</sub> 2Bz4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·2HCl	Vinho	722,70	70	33,22 (33,24)	2,49 (2,79)	7,94 (7,75)	188-190 (175-177)

\*Decompõe: dec; H<sub>py</sub>: Hidrogênio da piridina; <sup>a</sup> $\Lambda_M$ : ( $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ) DMF~ $1,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> Valores teóricos em parênteses; <sup>c</sup> Pontos de fusão das tiossemicarbazonas entre parênteses.

Os resultados sugerem a formação de compostos de ouro(III) e apenas um complexo de ouro(I), [Au(H<sub>py</sub>2Fo4pT)Cl] (**1**). As análises condutimétricas (DMF~ $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) indicam que os complexos [Au(H<sub>py</sub>2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>]Cl·H<sub>2</sub>O (**3**), [Au(H<sub>py</sub>2Ac4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl (**4**) e [Au(H<sub>py</sub>2Bz4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl·2HCl (**5**) são eletrólitos 1:1<sup>9</sup>. No complexo [Au(2Ac4oT)Cl][AuCl<sub>2</sub>] (**2**) há um ligante aniônico e um cloreto ligados ao centro de ouro(III) e um contra-íon [AuCl<sub>2</sub>]. Em todos os outros casos a tiossemicarbazona encontra-se em sua forma neutra, protonada no nitrogênio da piridina. Essa proposta é discutida posteriormente com base nos espectros no infravermelho e de RMN. Como já mencionado, o complexo (**1**) contém ouro(I). Os demais complexos contêm ouro(III). De acordo com a análise elementar e a curva termogravimétrica (curva TG) do complexo (**3**) uma perda de massa de 2,94 % próxima a 158 °C indica a presença de uma molécula de H<sub>2</sub>O, (valor teórico: 3,15 %) (Figura 5.2). Na curva TG para o complexo (**5**) observa-se uma perda de massa de 14,90 % em torno de 200 °C que confirma a presença de três moléculas de HCl (valor teórico: 15,15 %).

<sup>9</sup> W. J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

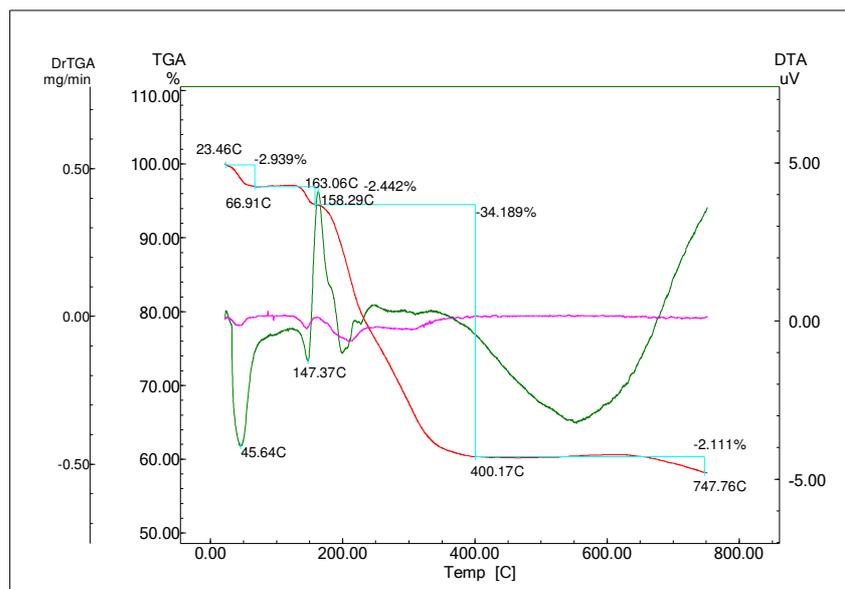


Figura 5.2 - Curva termogravimétrica para o complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (3).

O espectro de massas com ionização por *electronspray* no modo positivo (ESI(+)-MS) do complexo  $[\text{Au}(2\text{Ac}4\text{oT})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$  (2), feito em solução de metanol, mostra o cátion de relação massa/carga ( $m/z$ ) 515,0357 como o sinal mais abundante, que foi atribuído à espécie  $[\text{Au}(2\text{Ac}4\text{oT})\text{Cl}]^+$  (teórico: 515,0321<sup>10</sup>). Já no espectro obtido no modo negativo (ESI(-)-MS) aparece um pico-base com  $m/z$  266,9003 com um perfil isotópico característico da presença de cloro, que justifica o contra-íon  $[\text{AuCl}_2]^-$  (teórico:  $m/z$  266,9043<sup>10</sup>). Outro dado importante que contribui para a atribuição do contra-íon  $[\text{AuCl}_2]^-$  é a porcentagem de ouro analisada por absorção atômica que mostrou um valor de 52,34% (teórico: 50,27 %) indicando a presença de dois mols de ouro. A literatura apresenta outros exemplos de complexos de ouro de tiossemicarbazonas contendo  $[\text{AuCl}_2]^-$ <sup>11</sup>. Na figura 5.3 são apresentados os espectros de massas obtidos para o complexo (2). Nos espectros de massas dos complexos (4) e (5) obtidos no modo positivo aparece um sinal com  $m/z$  515,15 e  $m/z$  577,04, respectivamente, atribuídos a espécie do tipo  $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}]^+$ , cujos valores teóricos são de 515,04 e 577,05, respectivamente. A figura 5.4 mostra as propostas estruturais para os complexos de ouro.

<sup>10</sup> ICMS Solutions Shimadzu.

<sup>11</sup> A. Srekanth, H-K. Fun, M.R.P. Kurup, Inorg. Chem. Commun. 7 (2004) 1250.

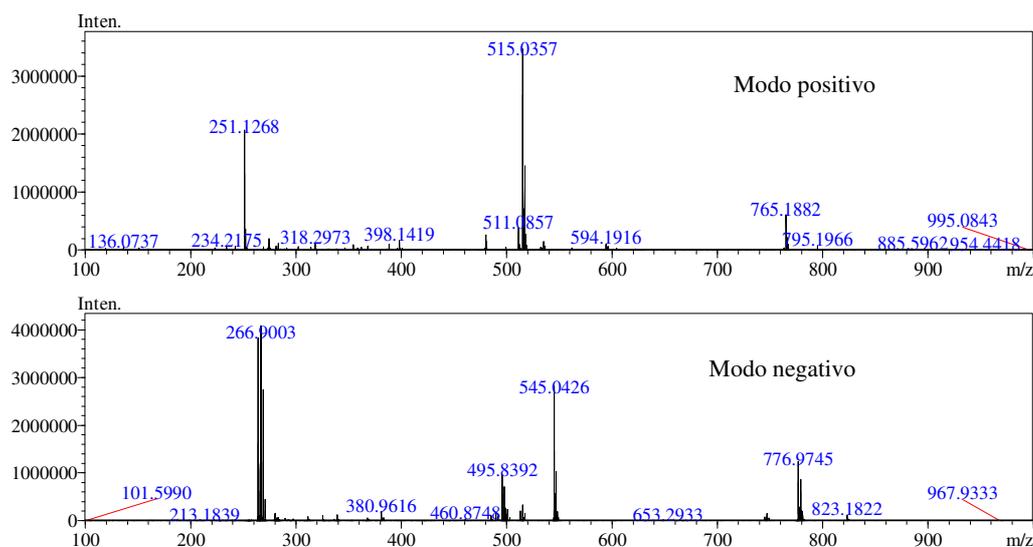


Figura 5.3 Espectros de massas do complexo  $[\text{Au}(2\text{Ac}4\text{oT})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$  (**2**) em metanol.

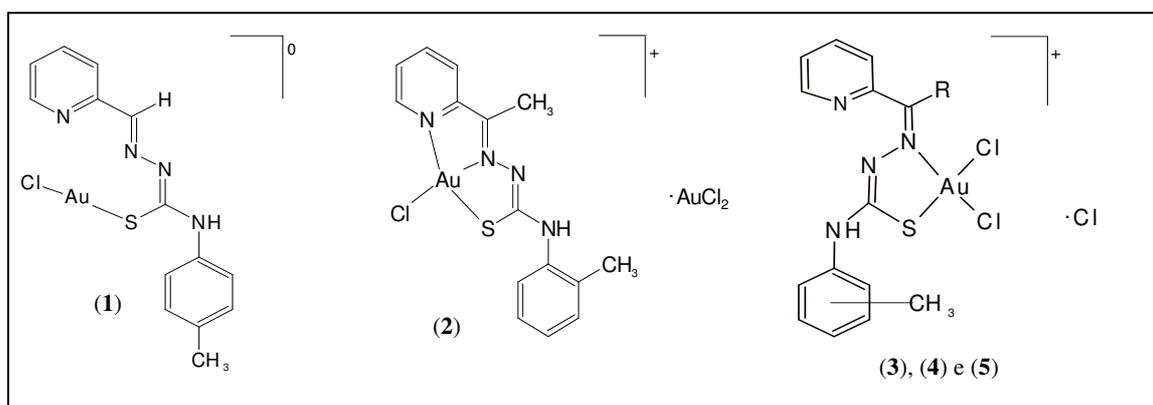


Figura 5.4 – Estruturas propostas para os complexos de ouro (I, III) com *N*(4)-toluyl tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.

#### Espectroscopia no Infravermelho dos complexos de ouro(I, III)

A tabela 5.1.2 apresenta as atribuições das bandas nos espectros no infravermelho das tiossemicarbazonas livres e seus complexos de ouro. Nos espectros de todos os complexos de ouro, exceto para  $[\text{Au}(2\text{Ac}4\text{oT})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$  (**2**) observa-se o surgimento de uma banda forte e larga entre  $2868\text{-}2783\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento  $\nu(\text{N}_{\text{py}}\text{-H})$ , sugerindo a protonação no nitrogênio do anel piridínico<sup>7,12</sup>. A banda característica do estiramento  $\nu(\text{C}=\text{S})$ , que aparece na faixa de  $870\text{-}815\text{ cm}^{-1}$  nos espectros das tiossemicarbazonas livres, encontra-se entre  $873\text{-}825\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos. Esse pequeno deslocamento é compatível com a presença do enxofre na forma de tiona<sup>13,14,15</sup>. No

<sup>12</sup> B. Chenon, C. Sandorfy, Can. J. Chem. 36 (1958) 1181.

<sup>13</sup> T.S. Lobana, S. Khanna, R.J. Butcher, Inorg. Chem. Commun. 11 (2008) 1433.

<sup>14</sup> S.D. Khanye, N.B. Báthori, G.S. Smith, K. Chibale, Dalton Trans. 39 (2010) 2697.

<sup>15</sup> A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1692.

espectro do complexo (**2**) o deslocamento é de  $49\text{ cm}^{-1}$ , o que está de acordo com a presença de enxofre na forma de tiolato.<sup>16</sup>

No complexo (**1**) a banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{N})$  e ao modo de deformação no plano do anel da piridina não sofreram deslocamentos significativos com a coordenação, indicando que o anel da piridina não estaria envolvido na coordenação ao metal. Esses resultados comparados aos obtidos por microanálises e medidas condutimétricas sugerem que no complexo (**1**) a tiossemicarbazona encontra-se coordenada apenas através do átomo de enxofre. Duas novas bandas em  $330\text{ cm}^{-1}$  e  $323\text{ cm}^{-1}$  no espectro do complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Fo}4p\text{T})\text{Cl}]$  (**1**) foram atribuídas às vibrações  $\nu(\text{Au}-\text{S})$ <sup>17</sup> e  $\nu(\text{Au}-\text{Cl})$ .<sup>18,19</sup>

Os deslocamentos observados na banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , entre  $1590\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$  nos espectros das tiossemicarbazonas livres e  $1599\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**3**),  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}$  (**4**) e  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Bz}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{HCl}$  (**5**), indicam a coordenação pelo nitrogênio imínico. A banda característica do modo de deformação no plano do anel da piridina não variou significativamente, aparecendo entre  $622\text{-}612\text{ cm}^{-1}$  nos espectros das tiossemicarbazonas livres e após a coordenação entre  $620\text{-}613\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos, sugerindo que não ocorreu coordenação através do nitrogênio da piridina.

O surgimento de novas bandas nos espectros dos complexos (**2-5**) na região entre  $398\text{-}374\text{ cm}^{-1}$ ,  $358\text{-}351\text{ cm}^{-1}$  e  $328\text{-}304\text{ cm}^{-1}$  foi atribuído às vibrações  $\nu(\text{Au}-\text{N})$ <sup>9</sup>,  $\nu(\text{Au}-\text{S})$ <sup>7</sup> e  $\nu(\text{Au}-\text{Cl})$ <sup>13,14</sup>, respectivamente. A absorção em  $385\text{ cm}^{-1}$  no espectro de  $[\text{Au}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$  (**2**) foi atribuída à vibração  $\nu(\text{Au}-\text{N}_{\text{py}})$ . Os resultados sugerem, portanto, que no complexo (**1**) a tiossemicarbazona está coordenada ao metal através apenas do átomo de enxofre. No complexo (**2**) a coordenação ocorre através do sistema  $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ . Nos complexos (**3-5**) a ligação se dá pelos átomos de enxofre e nitrogênio imínico. As figuras 5.5 e 5.6 mostram os espectros no infravermelho de  $\text{H}2\text{Ac}4m\text{T}$  e seu complexo de ouro(III) nas regiões entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  e  $500\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ .

<sup>16</sup> J.G. Silva, L.S. Azzolini, S.M.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 2301.

<sup>17</sup> J.S. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, J. Ellena, A. Sánchez, J. Sordo, C. Taboada, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1858.

<sup>18</sup> A. Garza-Ortiz, J. Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A.L. Spek, J. Reedijk, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 1922.

<sup>19</sup> K. Ortner, U. Abram, Polyhedron 18 (1999) 749.

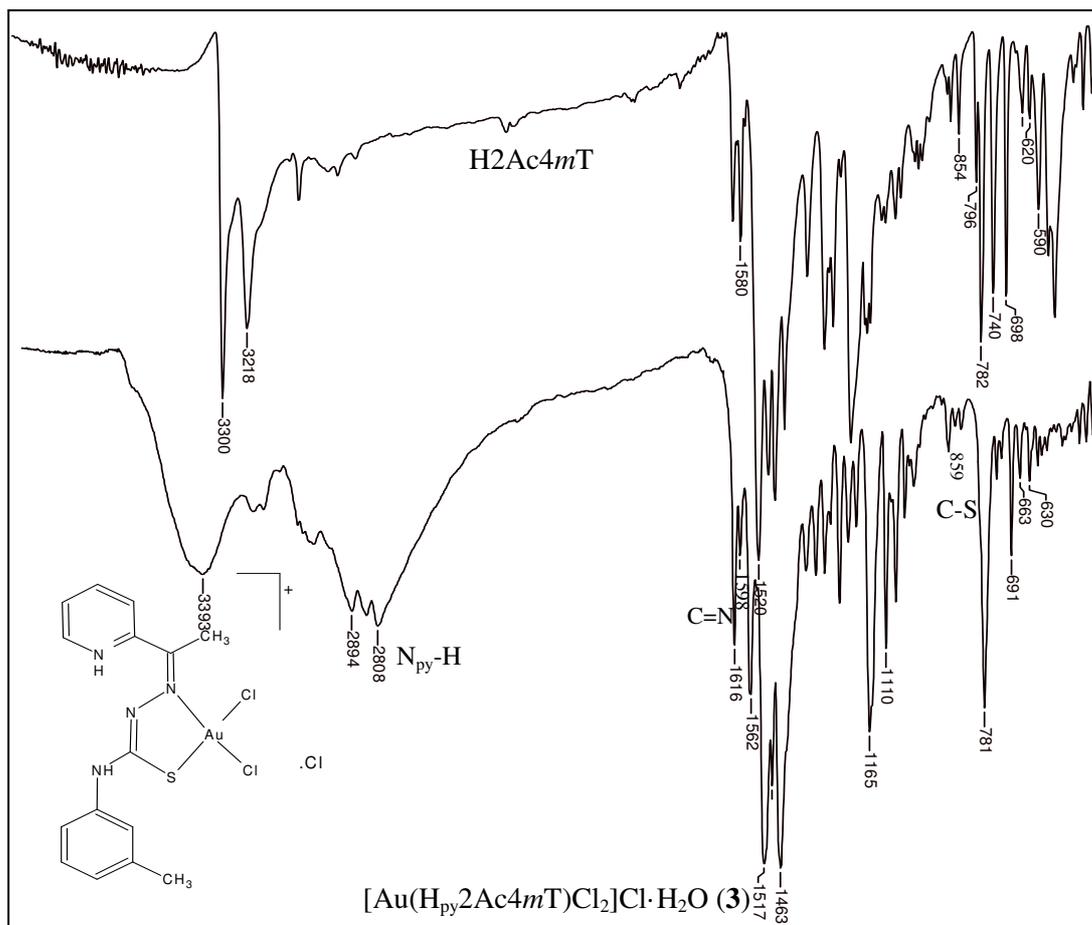


Figura 5.5 – Espectros no infravermelho de H2Ac4mT e seu complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}2}\text{Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (3) obtidos em pastilha de KBr,  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

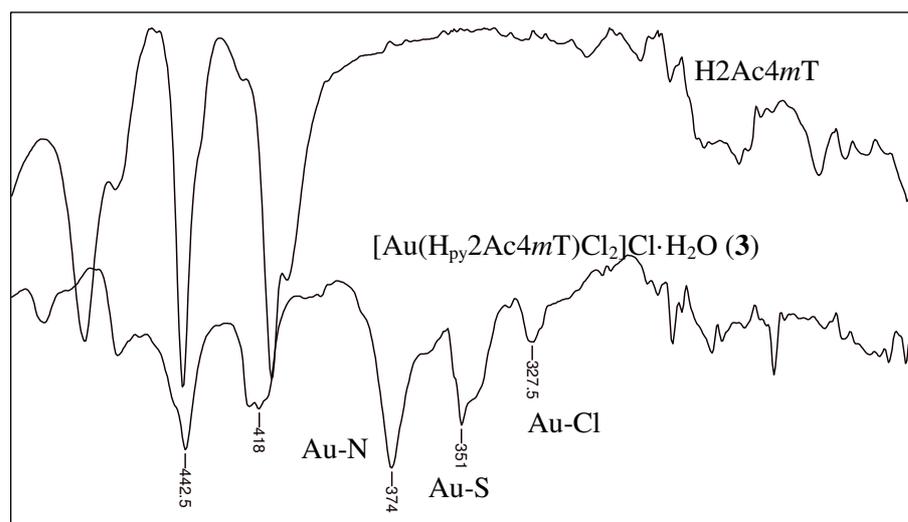


Figura 5.6 – Espectros no infravermelho H2Ac4mT e seu complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}2}\text{Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (3) obtidos na região de  $500\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ , suposte CsI/nujol.

Tabela 5.1.2 - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos de ouro(I, III) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas

Composto	$\nu(\text{N}_{\text{py}}-\text{H})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	$\nu(\text{M}-\text{N}_{\text{py}})$	$\nu(\text{M}-\text{S})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$
<b>H2Fo4pT</b>	-	<b>1587m</b>	<b>870m</b>	<b>623f</b>				
[Au(H <sub>py</sub> 2Fo4pT)Cl] ( <b>1</b> )	2862F	1595m	873m	628f	-	-	330	323
<b>H2Ac4oT</b>	-	<b>1581m</b>	<b>822m</b>	<b>622f</b>	-	-	-	-
[Au(2Ac4oT)Cl][AuCl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> )	-	1537m	773m	617f	398	385	351	315
<b>H2Ac4mT</b>	-	<b>1590m</b>	<b>854m</b>	<b>621f</b>	-	-	-	-
[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> )	2808F	1598m	859m	620f	374	-	351	328
<b>H2Ac4pT</b>	-	<b>1587m</b>	<b>816m</b>	<b>622f</b>	-	-	-	-
[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl ( <b>4</b> )	2841F	1599m	826m	619f	398	-	351	315
<b>H2Bz4pT</b>	-	<b>1585m</b>	<b>815m</b>	<b>612f</b>	-	-	-	-
[Au(H <sub>py</sub> 2Bz4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·2HCl ( <b>5</b> )	2783F	1595m	825m	613f	385	-	358	304

\* F = forte, m = media, f = fraca.

*Ressonância Magnética Nuclear dos complexos de ouro(I, III)*

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos de ouro(I, III) foram feitos em  $\text{MeOD-}d_4$  e em  $\text{DMSO-}d_6$ . Todos os complexos reagem com  $\text{DMSO-}d_6$ , porém  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Bz}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{HCl}$  (**5**) parece sofrer reação mais lentamente. Apesar da instabilidade das soluções dos complexos em  $\text{DMSO-}d_6$ , os espectros obtidos nesse solvente mostram claramente os deslocamentos químicos dos sinais das tiossemicarbazonas após a coordenação. Também se observa, em todos os casos, um sinal muito desprotegido (entre 15-17 ppm), compatível com a protonação do nitrogênio da piridina, exceto no espectro de  $[\text{Au}(2\text{Ac}4o\text{T})][\text{AuCl}_2]$  (**2**). Essa observação está de acordo com a análise dos espectros no infravermelho que mostram, para todos os complexos exceto **2**, uma banda entre 2868-2783  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a  $\nu(\text{N}_{\text{py}}\text{-H})$ . Em todos os complexos à exceção de **2** ocorre o desaparecimento do sinal de  $\text{N}(2)\text{-H}$  sugerindo que, exceto no composto (**2**), a tiossemicarbazona encontra-se na forma neutra.

O uso de  $\text{MeOD-}d_4$  para obtenção dos espectros RMN de  $^1\text{H}$  permitiu a observação dos deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênios das tiossemicarbazonas após a coordenação. No entanto, como os sinais de  $\text{N-H}$  não são observados em metanol devido à troca rápida do próton com o solvente, os sinais de  $\text{N-H}$  foram atribuídos em  $\text{DMSO-}d_6$  e são apresentados na tabela 5.1.3. Não foi possível obter os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os complexos de ouro em ambos os solventes devido à baixa solubilidade dos compostos.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{MeOD-}d_4$  de 2-acetilpiridina *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas aparecem alguns sinais da piridina duplicados, indicando a presença dos isômeros *E* e *Z*, com a espécie majoritária em 80 % de abundância aproximadamente. Já nos espectros de 2-formil e 2-benzoilpiridina *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas não foi possível visualizar sinais duplicados provavelmente devido à baixa solubilidade dos compostos.

Após a coordenação observa-se um deslocamento significativo de todos os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  das tiossemicarbazonas. Apenas uma espécie isomérica pode ser observada nos espectros dos complexos, com exceção de  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Fo}4p\text{T})\text{Cl}]$  (**1**), que se apresenta como uma mistura dos isômeros *E* e *Z*. No entanto, como não se observam os sinais de  $\text{N-H}$  devido à troca rápida dos prótons com o solvente, não foi possível atribuir a forma isomérica assumida nos complexos, com exceção do complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Bz}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{HCl}$  (**5**). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  de  $\text{H}2\text{Bz}4p\text{T}$  mostra os sinais dos isômeros *E* e *Z*, com os sinais característicos de *Z* em maior proporção (~75 %). Como o complexo (**5**) é mais estável e solúvel em  $\text{DMSO-}d_6$  foi possível identificar em seu espectro a presença da tiossemicarbazona na forma *Z*. As figuras 5.7 e 5.8 apresentam os espectros de  $\text{H}2\text{Ac}4p\text{T}$  e seu complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}$  (**4**) em  $\text{MeOD-}d_4$  e de  $\text{H}2\text{Bz}4p\text{T}$  e seu complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Bz}4p\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{HCl}$  (**5**) em  $\text{DMSO-}d_6$ .

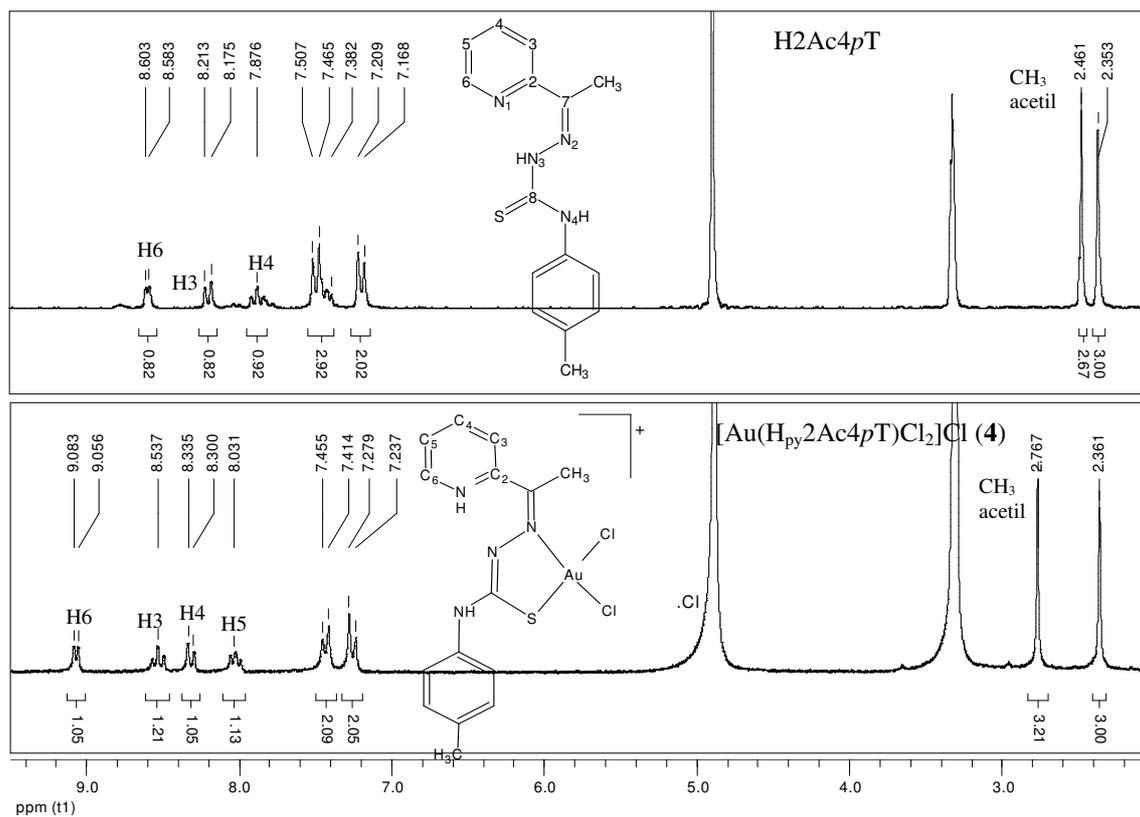


Figura 5.7 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H entre 10-2 ppm de H<sub>2</sub>Ac<sub>4</sub>pT e seu complexo de ouro(III) [Au(H<sub>py</sub>2Ac<sub>4</sub>pT)Cl<sub>2</sub>]Cl (4) em MeOD-*d*<sub>4</sub>, 200 MHz.

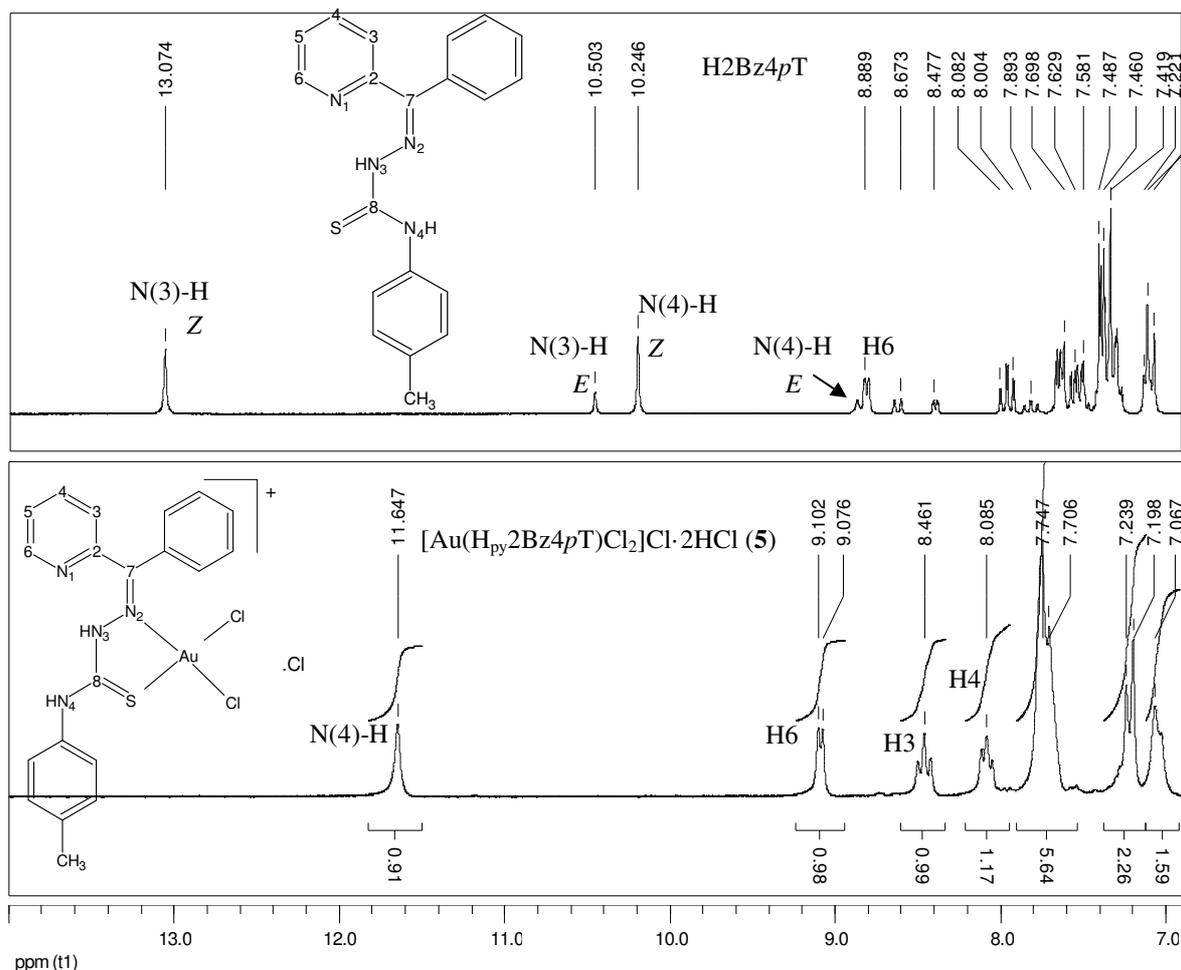


Figura 5.8 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H entre 14-7 ppm de H<sub>2</sub>Bz4pT e seu complexo de ouro(III) [Au(H<sub>py</sub>2ABz4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl·2HCl (5) em DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz.

Como uma terceira tentativa para melhorar a atribuição de sinais e caracterização dos complexos de ouro também foram realizados experimentos de RMN de <sup>1</sup>H utilizando CDCl<sub>3</sub>, que é um solvente não coordenante e possibilita a visualização dos sinais de N-H. No entanto, só foi possível observar os sinais nos espectros dos complexos [Au(H<sub>py</sub>2Fo4pT)Cl] (1) e [Au(2Ac4oT)Cl][AuCl<sub>2</sub>] (2), devido à baixa solubilidade dos compostos nesse solvente. Novamente observa-se um sinal muito desprotegido (em torno de 15,9 ppm) característico de N<sub>py</sub>-H, o desaparecimento de N(3)-H e os deslocamentos dos sinais da tiossemicarbazona após a coordenação no espectro de 1, enquanto que no espectro de 2 observa-se a ausência dos sinais de N<sub>py</sub>-H e N(3)-H e os deslocamentos dos sinais em relação ao espectro da tiossemicarbazona livre. Essas informações confirmam as propostas anteriormente feitas através dos dados analíticos, espectros no infravermelho e de RMN em MeOD-*d*<sub>4</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub> para os complexos (1) e (2). A figura 5.9 exhibe os espectros de 1 e 2 obtidos em CDCl<sub>3</sub>.

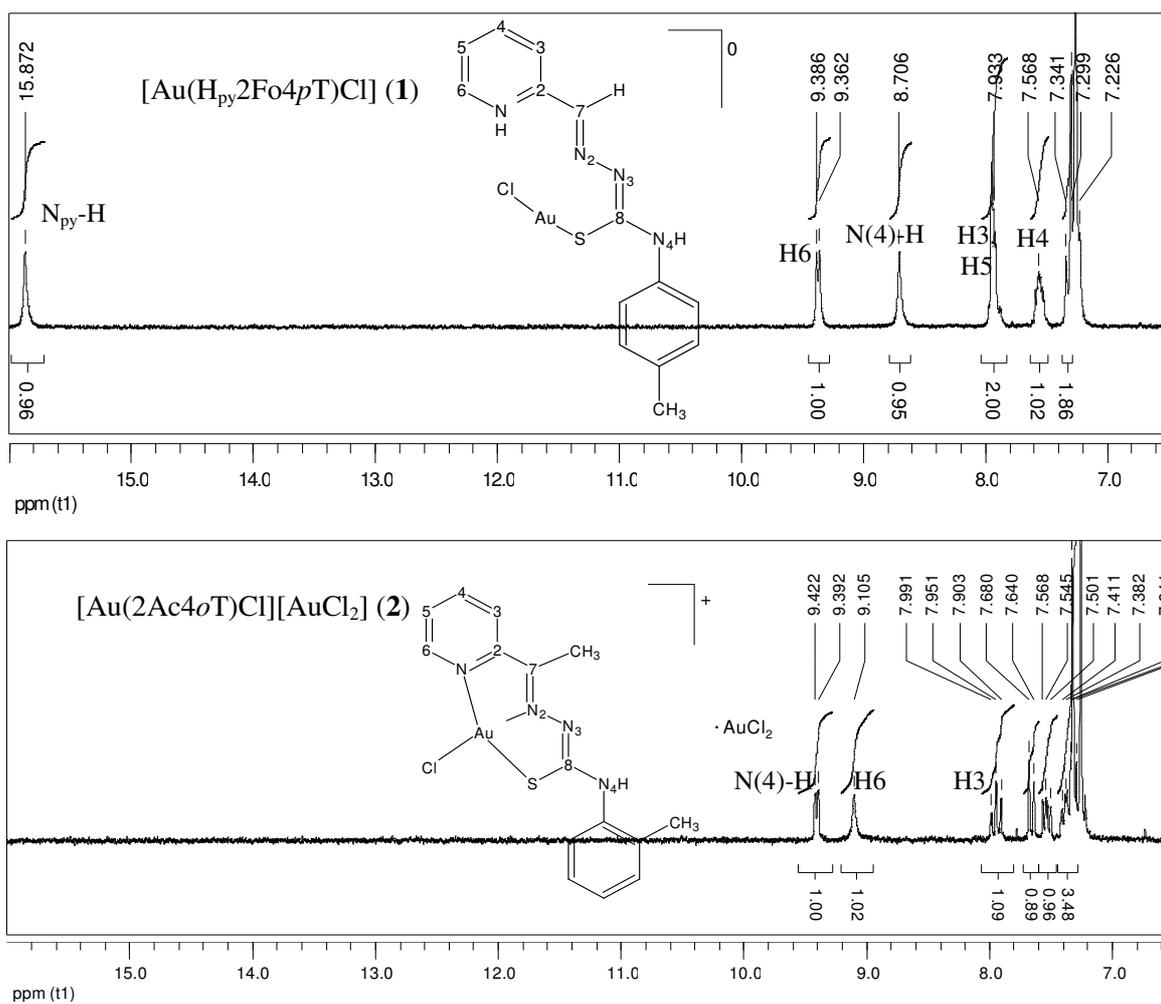


Figura 5.9 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H entre 16-6,5 ppm dos complexos [Au(H<sub>py</sub>2Fo4pT)Cl] (**1**) e [Au(2Ac4oT)Cl][AuCl<sub>2</sub>] (**2**) em CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz.

Tabela 5.1.3 - Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) e multiplicidade (M) dos principais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos de ouro(I, III) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas (MeOD- $d_4$  e DMSO- $d_6$ ), 200MHz

Composto									
	H3 (d) 1	H4 (t) 1	H5 (t) 1	H6 (d) 1	N(4)H (s) 1 (DMSO- $d_6$ )	N(3)H (s) 1 (DMSO- $d_6$ )	N <sub>py</sub> H (s) 1 (DMSO- $d_6$ )	H15 (s) 3	
<b>H2Fo4pT</b>	<b>8,44</b>	<b>7,85</b>	<b>7,39</b>	<b>8,60</b>	<b>10,19</b>	<b>11,99</b>	-	<b>2,32</b>	
[Au(H <sub>py</sub> 2Fo4pT)Cl] (1)	8,40-8,36	8,53	7,97	8,86-8,83	10,56	-	15,37	2,41	
<b>H2Ac4oT</b>	<b>8,25-8,21</b>	<b>7,84</b>	<b>7,39</b>	<b>8,59-8,57</b>	<b>10,08</b>	<b>10,65</b>	-	<b>2,32</b>	
[Au(2Ac4oT)Cl][AuCl <sub>2</sub> ] (2)	8,25-8,23	8,50	7,99	9,04-9,02	11,35	-	16,39	2,35	
<b>H2Ac4mT</b>	<b>8,22-8,17</b>	<b>7,88</b>	<b>7,25</b>	<b>8,61-8,59</b>	<b>10,13</b>	<b>10,63</b>	-	<b>2,37</b>	
[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·H <sub>2</sub> O (3)	8,36-8,31	8,55	8,04	9,10	11,43	-	16,33	2,39	
<b>H2Ac4pT</b>	<b>8,21-8,18</b>	<b>7,88</b>	<b>7,47-7,38</b>	<b>8,60-8,58</b>	<b>10,13</b>	<b>10,61</b>	-	<b>2,35</b>	
[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl (4)	8,34-8,30	8,54	8,03	9,09-9,07	11,41	-	16,29	2,36	
<b>H2Bz4pT</b>	<i>Z</i>	<b>8,62</b>	<b>7,93</b>	<b>7,81</b>	<b>8,81</b>	<b>10,23</b>	<b>13,07</b>	-	<b>2,31</b>
	<i>E</i>					<b>8,93</b>	<b>10,50</b>	-	
[Au(H <sub>py</sub> 2Bz4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·2HCl (5)	7,21-7,17	8,43	8,03	9,17	11,67	-	15,62	2,29	

s = singleto, d = dupletto, t = tripleto

### 5.2- Complexos de platina(II, IV) com *N*(4)-orto-, *N*(4)-meta- e *N*(4)-para-toluiltiossemicarbazonas de 2-acetilpiridina

Foram sintetizados os complexos [Pt(H2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>] (**6**), [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**), [Pt(2Ac4pT)Cl] (**8**), [Pt(2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>OH] (**9**), [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (**10**) e [Pt(2Ac4pT)Cl<sub>2</sub>OH] (**11**) com *N*(4)-orto-, *N*(4)-meta- e *N*(4)-para-toluil-tiossemicarbazonas de 2-acetilpiridina. Os complexos (**6-8**) são de platina(II) e (**9-11**) de platina(IV). Os produtos foram caracterizados por seus pontos de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar e por seus espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear. O complexo (**7**) também foi caracterizado pela análise da curva termogravimétrica. Foram obtidos cristais a partir da solubilização de **6** e **7** em DMSO:acetona 1:9, os quais foram submetidos a análise por difração de raios X de monocristal.

#### 5.2.1- Análises dos complexos de platina(II) e platina(IV)

Tabela 5.2.1 – Dados analíticos obtidos para complexos de platina(II, IV) das tiossemicarbazonas derivadas de e 2-acetilpiridina

Composto	Cor	MM g mol <sup>-1</sup>	Λ <sub>M</sub> <sup>a</sup>	Análise Elementar <sup>b</sup> (%)			Temp. de fusão <sup>c</sup> °C
				C	H	N	
<b>6</b> [Pt(H2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> ]	Castanha	550,36	21	32,73 (32,73)	2,63 (2,93)	9,96 (10,18)	>300 (162-163)
<b>7</b> [Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl]	Castanha	531,92	14	34,44 (33,87)	3,28 (3,22)	10,54 (10,53)	dec. > 286 (139-140)
<b>8</b> [Pt(2Ac4pT)Cl]	Castanha	513,90	17	35,23 (35,06)	2,91 (2,94)	10,49 (10,90)	>300 (154-156)
<b>9</b> [Pt(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> OH]	Castanha	566,36	22	32,51 (31,81)	2,62 (2,85)	9,79 (9,89)	dec. > 269 (162-163)
<b>10</b> [Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH]	Castanha	566,36	16	31,97 (31,81)	2,80 (2,85)	9,53 (9,89)	dec. > 250 (139-140)
<b>11</b> [Pt(2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> OH]	Castanha	566,36	21	31,83 (31,81)	2,74 (2,85)	10,03 (9,89)	>300 (154-156)

\*Decompõe: dec; H<sub>py</sub>: Hidrogênio da piridina; <sup>a</sup>Λ<sub>M</sub>: (Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>) DMF~1,0x10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>Valores teóricos em parênteses; <sup>c</sup> Pontos de fusão das tiossemicarbazonas entre parênteses.

As análises condutimétricas (DMF~1x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) indicam que todos os complexos de platina(II, IV) são neutros. Conforme as análises dos complexos de platina(II), o complexo (**6**) é formado por uma molécula da tiossemicarbazona em sua forma neutra e dois ligantes cloreto coordenados ao centro metálico. No complexo (**7**) o íon metálico coordena-se à tiossemicarbazona na forma aniônica, e a um ligante cloreto e uma molécula de água. A presença de uma molécula de H<sub>2</sub>O foi sugerida pela curva TG que mostrou uma perda de massa de 2,67 % próxima a 174 °C (teórico: 3,38 %) e pelos experimentos de RMN de <sup>1</sup>H utilizando DMSO-*d*<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O, discutidos posteriormente. Já no complexo (**8**) a tiossemicarbazona está coordenada ao metal também na forma aniônica

juntamente com um ligante cloreto. Todos os complexos de platina(IV) são do tipo  $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2\text{OH}]$ . Na síntese desses complexos utilizou-se água como solvente, possibilitando a coordenação de hidroxilas ao centro metálico.

*Espectroscopia no Infravermelho dos complexos de platina(II, IV)*

A tabela 5.2.2 mostra as atribuições das principais bandas no infravermelho dos complexos platina(II, IV) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas de 2-acetilpiridina. Nos espectros dos complexos de platina (II, IV) também foram observados deslocamentos significativos nas bandas atribuídas aos estiramentos  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ,  $\nu(\text{C}=\text{S})$  e no modo de deformação no plano do anel da piridina, exceto para os complexos  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oT})\text{Cl}_2]$  (**6**) e  $[\text{Pt}(2\text{Ac}_4\text{mT})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$  (**7**) cujos espectros não sofreram grandes variações no modo de deformação do anel da piridina no plano, sugerindo a coordenação de **6** e **7** através dos átomos de nitrogênio imínico e de enxofre. A banda característica de estiramento  $\nu(\text{C}=\text{N})$  é observada entre  $1590\text{-}1581\text{ cm}^{-1}$  nos espectros das tiossemicarbazonas livres e sofre um deslocamento para  $1592\text{-}1557\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos, o que sugere a coordenação pelo nitrogênio heteroaromático. Na figura 5.10 estão os espectros de  $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oT}$  e seus complexos de platina(II, IV) na região entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

A banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{S})$  é observada entre  $854\text{-}816\text{ cm}^{-1}$  nos espectros das tiossemicarbazonas livres, enquanto que nos espectros dos complexos ela sofre um deslocamento para a região entre  $774\text{-}760\text{ cm}^{-1}$ , compatível com a presença do átomo de enxofre na forma de tiolato.<sup>15</sup>

A coordenação através do nitrogênio heteroaromático foi sugerida pelas variações observadas na banda atribuída ao modo de deformação no plano do anel da piridina, que nos espectros das tiossemicarbazonas é observada entre  $622\text{-}621\text{ cm}^{-1}$  e desloca-se para  $636\text{-}631\text{ cm}^{-1}$  nos complexos (**8-11**).

Além disso, verifica-se, para os complexos (**8-11**), o surgimento de bandas nas regiões entre  $431\text{-}419\text{ cm}^{-1}$ ,  $390\text{-}382\text{ cm}^{-1}$ ,  $343\text{-}324\text{ cm}^{-1}$  e  $313\text{-}304\text{ cm}^{-1}$  indicando vibrações características dos estiramentos  $\nu(\text{Pt}-\text{N})$ ,  $\nu(\text{Pt}-\text{S})$ ,  $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$  e  $\nu(\text{Pt}-\text{N}_{\text{py}})$ , respectivamente<sup>20,21</sup>. Em **6** e **7** observam-se as mesmas bandas à exceção da absorção atribuída à vibração  $\nu(\text{Pt}-\text{N}_{\text{py}})$ , de acordo com o não envolvimento do nitrogênio heteroaromático na complexação.

Assim, os resultados indicam que nos complexos (**6**) e (**7**) de platina(II) as tiossemicarbazonas estão coordenadas através dos átomos de enxofre e do nitrogênio imínico, enquanto que em **8** e nos complexos de platina(IV) (**9-11**) as tiossemicarbazonas estão coordenadas através do sistema  $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ . A figura 5.11 mostra as propostas estruturais dos complexos de platina(II, IV).

<sup>20</sup>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.

<sup>21</sup>D. Kovala-Demertzis, A. Papageorgiou, L. Papatheanis, A. Alexandratos, P. Dalezis, J.R. Miller, M.A. Demertzis, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1296.

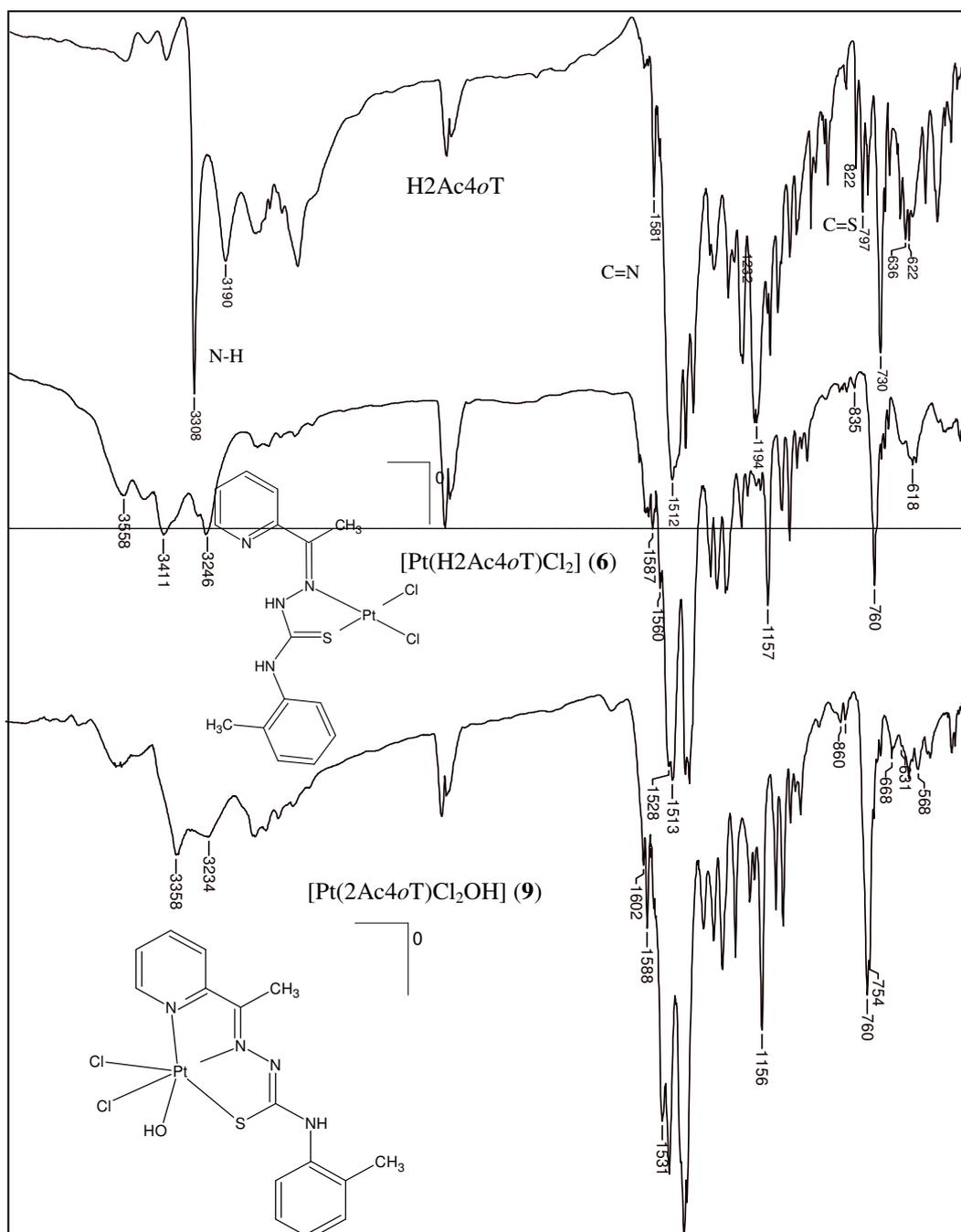


Figura 5.10 – Espectro de infravermelho de H<sub>2</sub>Ac<sub>4</sub>oT e seus complexos [Pt(H<sub>2</sub>Ac<sub>4</sub>oT)Cl<sub>2</sub>] (6) e [Pt(2Ac<sub>4</sub>oT)Cl<sub>2</sub>OH] (9) obtido em pastilha de KBr, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

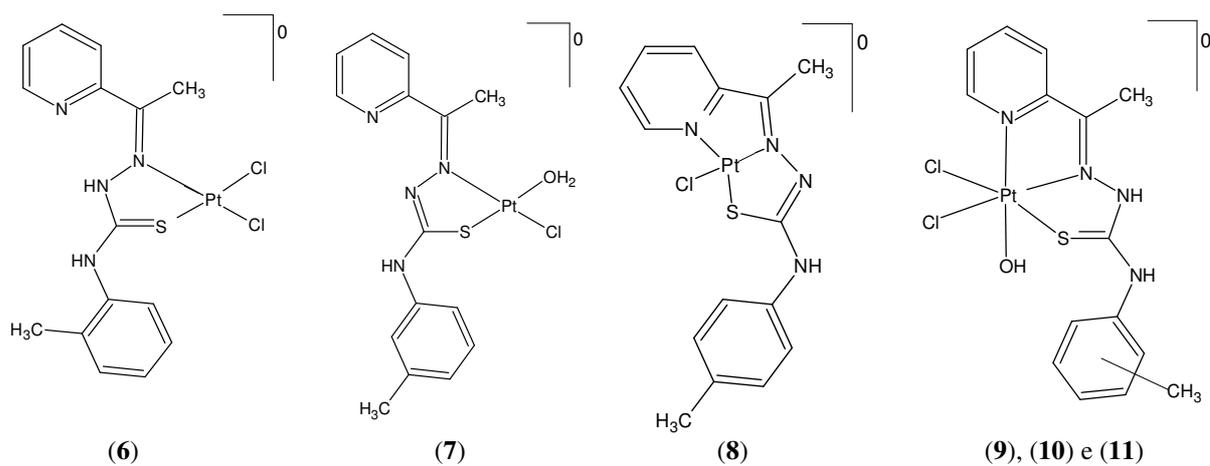
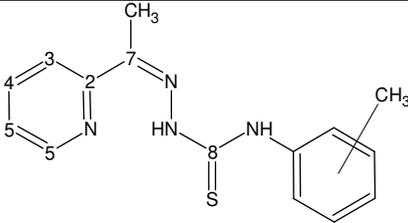


Figura 5.11 – Estruturas propostas para os complexos de platina(II)  $[Pt(H2Ac4oT)Cl_2]$  (6),  $[Pt(2Ac4mT)(H_2O)Cl]$  (7) e  $[Pt(2Ac4pT)Cl]$  (8) e para os complexos de platina(IV)  $[Pt(2Ac4oT)Cl_2OH]$  (9),  $[Pt(2Ac4mT)Cl_2OH]$  (10) e  $[Pt(2Ac4pT)Cl_2OH]$  (11).

Tabela 5.2.2 - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos platina(II, IV) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas de 2-acetilpiridina

								
Composto	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	$\nu(\text{M}-\text{S})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$	$\nu(\text{M}-\text{N}_{\text{py}})$	$\nu(\text{M}-\text{OH})$
* F = <del>1024</del> <b>1581m</b> , f = <del>fracço</del>	<b>1581m</b>	<b>822m</b>	<b>622f</b>	-	-	-	-	-
[Pt(H2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	1587m	760m	618f	425	342	338	-	-
[Pt(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>9</b> )	1588m	760m	631f	419	385	337; 324	304	520
<b>H2Ac4mT</b>	<b>1590m</b>	<b>854m</b>	<b>621f</b>	-	-	-	-	-
[Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl] ( <b>7</b> )	1592m	774m	622f	428	340	313	-	-
[Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>10</b> )	1563m	774m	636f	430	390	342; 329	304	511
<b>H2Ac4pT</b>	<b>1587m</b>	<b>816m</b>	<b>622f</b>	-	-	-	-	-
[Pt(2Ac4pT)Cl] ( <b>8</b> )	1557m	766m	636f	427	382	340	307	-
[Pt(2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>11</b> )	1560m	768m	634f	431	385	343; 336	304	513

## Ressonância Magnética Nuclear dos complexos de platina(II, IV)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos complexos de platina(II) e platina(IV) foram obtidos em  $\text{DMSO-}d_6$ . As tabelas 5.2.3 e 5.2.4 mostram as principais atribuições para os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Após a coordenação, todos os sinais de  $^1\text{H}$  da piridina sofrem deslocamentos significativos em relação aos respectivos sinais nos espectros das tiossemicarbazonas livres. No entanto, com base nos espectros de infravermelho e nos baixos valores de condutividade molar, pode-se sugerir que nos complexos (6) e (7) a tiossemicarbazona estaria coordenada de modo bidentado, pelo sistema N-S. O fato de esses complexos reagirem com o solvente com o tempo corrobora a suposição de que conteriam um ligante bidentado. O complexo (8), que contém a tiossemicarbazona coordenada de modo tridentado, não reage com o  $\text{DMSO-}d_6$ . O desaparecimento do sinal de N3-H nos espectros dos complexos, exceto para o complexo  $[\text{Pt}(\text{H2Ac4oT})\text{Cl}_2]$  (6) (ver Figura 12) indica que as tiossemicarbazonas estão coordenadas em sua forma aniônica. Esse resultado está de acordo com as análises feitas anteriormente pelos espectros no infravermelho.

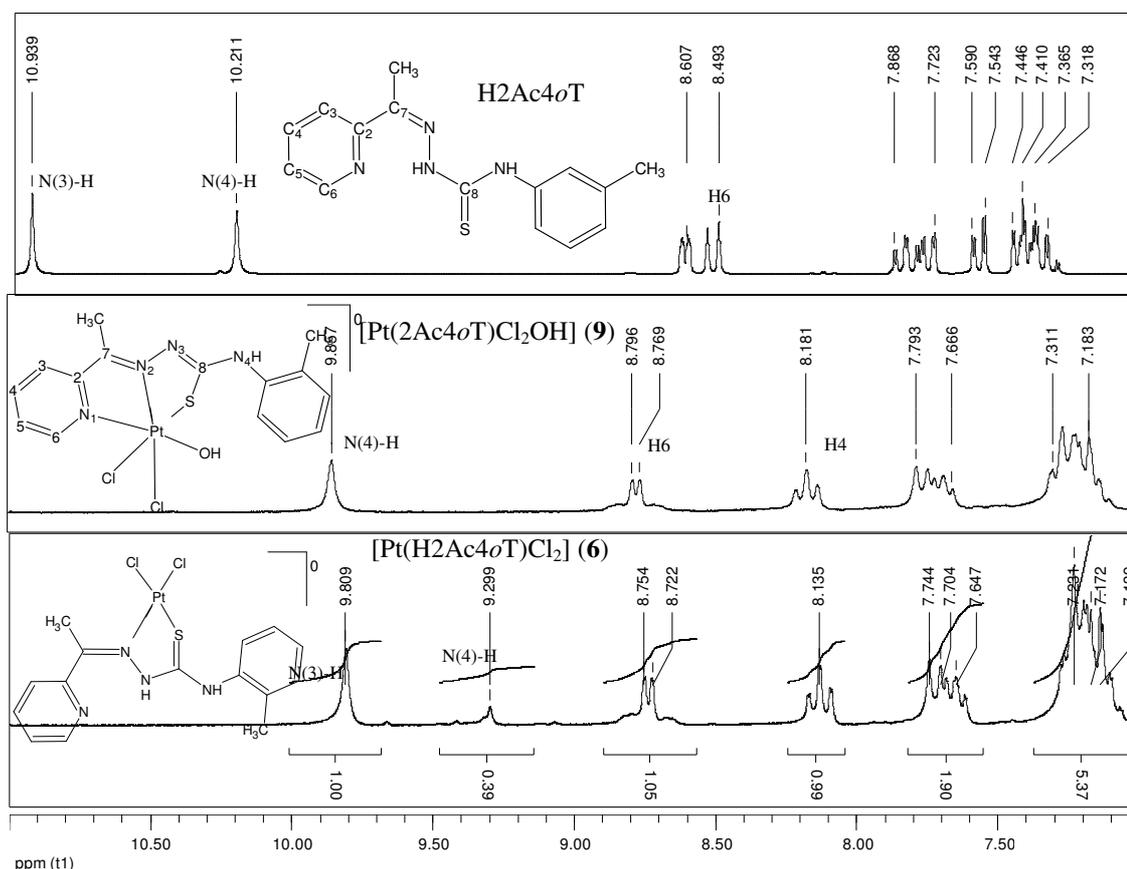


Figura 5.12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{H2Ac4oT}$  e seus complexos  $[\text{Pt}(\text{H2Ac4oT})\text{Cl}_2]$  (6) e  $[\text{Pt}(\text{2Ac4oT})\text{Cl}_2\text{OH}]$  (9) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

Não foi possível observar o sinal de O-H nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos de platina(IV). Este sinal poderia estar localizado juntamente com o da água. Dessa forma, foram realizados experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  sem e com adição de  $\text{D}_2\text{O}$  para verificar o desaparecimento ou

deslocamento de sinais. Em todos os espectros dos complexos de platina(IV), após adição de D<sub>2</sub>O, observa-se o desaparecimento do sinal da água do DMSO em 3,99 ppm com o aparecimento de um sinal intenso em 3,49 ppm, sugerindo a presença de OH coordenado. A figura 5.13 mostra os espectros de RMN de <sup>1</sup>H do complexo [Pt(2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>OH] (**9**) sem e com adição de D<sub>2</sub>O em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

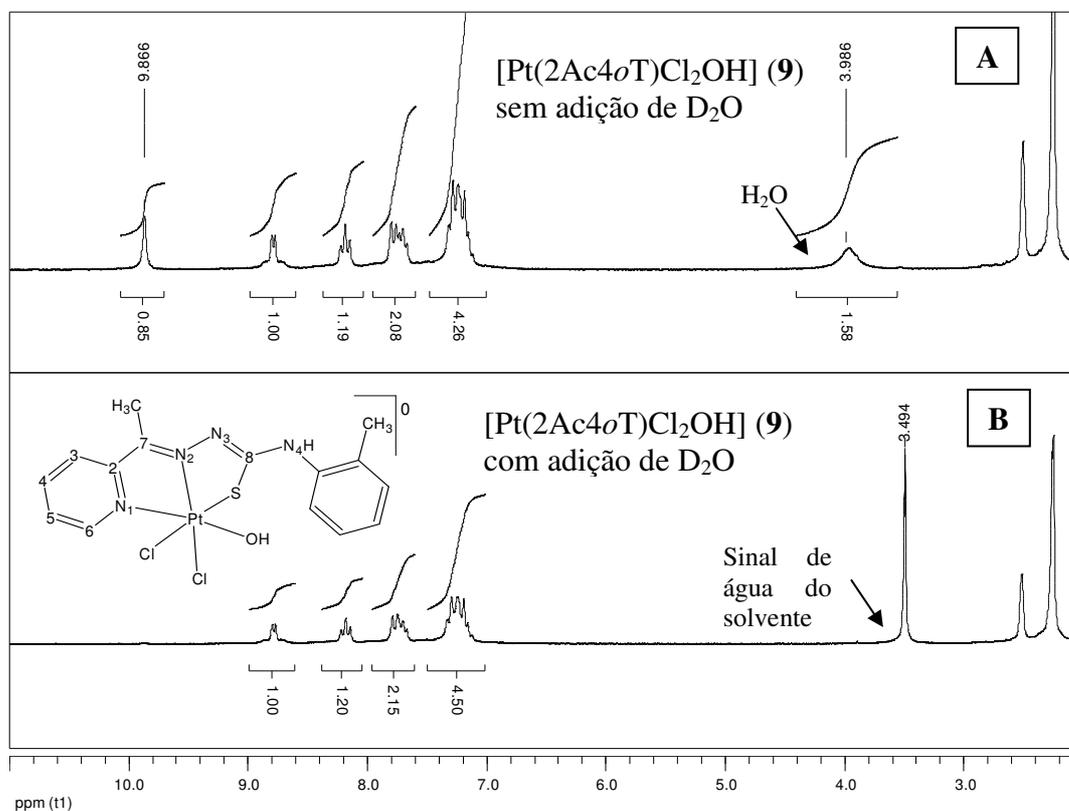
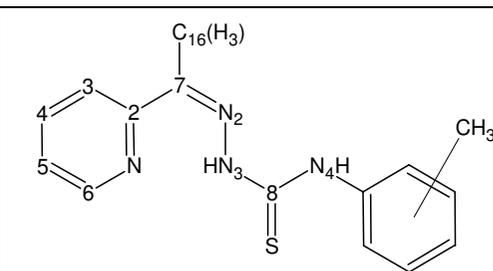


Figura 5.13 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do complexo [Pt(2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>OH] (**9**) sem e com adição de D<sub>2</sub>O em DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz.

No espectro do complexo [Pt(2Ac4*m*T)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**) o sinal da água (2H, 5,49 ppm) aparece muito desprotegido em relação ao sinal de água do solvente (~3,3 ppm em DMSO-*d*<sub>6</sub>) o que indica ser uma molécula de água coordenada. O mesmo experimento utilizando D<sub>2</sub>O, citado acima, foi realizado com o complexo (**7**), observando-se o desaparecimento do sinal em 5,49ppm.

Tabela 5.2.3 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) e multiplicidade (M) dos principais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos de platina(II, IV) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

Composto							
	H3 (d) 1	H4 (t) 1	H5 (t) 1	H6 (d) 1	N(4)H (s) 1	N(3)H (s) 1	H16 (s) 3
<b>H2Ac4oT</b>	<b>8,23</b>	<b>7,84</b>	<b>7,39</b>	<b>8,58</b>	<b>10,08</b>	<b>10,65</b>	<b>2,32</b>
[Pt(H2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	7,70	8,14	7,70	8,74	9,30	9,81	2,20
[Pt(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>9</b> )	7,77	8,18	7,70	8,80	9,86	-	2,24
<b>H2Ac4mT</b>	<b>8,20</b>	<b>7,88</b>	<b>7,25</b>	<b>8,60</b>	<b>10,13</b>	<b>10,63</b>	<b>2,36</b>
[Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl] ( <b>7</b> )	7,84	8,17	7,66	8,77	10,19	-	2,44
[Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH]( <b>10</b> )	7,86	8,20	7,72	8,81	10,22	-	2,44
<b>H2Ac4pT</b>	<b>8,20</b>	<b>7,88</b>	<b>7,47-7,38</b>	<b>8,59</b>	<b>10,13</b>	<b>10,61</b>	<b>2,35</b>
[Pt(2Ac4pT)Cl] ( <b>8</b> )	7,85	8,20	7,71	8,81	10,22	-	2,43
[Pt(2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>11</b> )	7,85	8,20	7,70	8,80	10,22	-	2,42

\*s = singlete, d = duplete, t = tripleto.

A tabela 5.2.4 apresenta as atribuições dos sinais de  $^{13}\text{C}$  para as tiossemicarbazonas e seus complexos de platina(II, IV). Os complexos de platina(II), à exceção do composto **(8)** (ver Figura 5.14), reagem com o solvente no tempo gasto para registrar o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Além disso, os compostos são muito pouco solúveis em  $\text{DMSO-}d_6$ . No entanto as atribuições dos sinais foram feitas com base nos espectros HMQC.

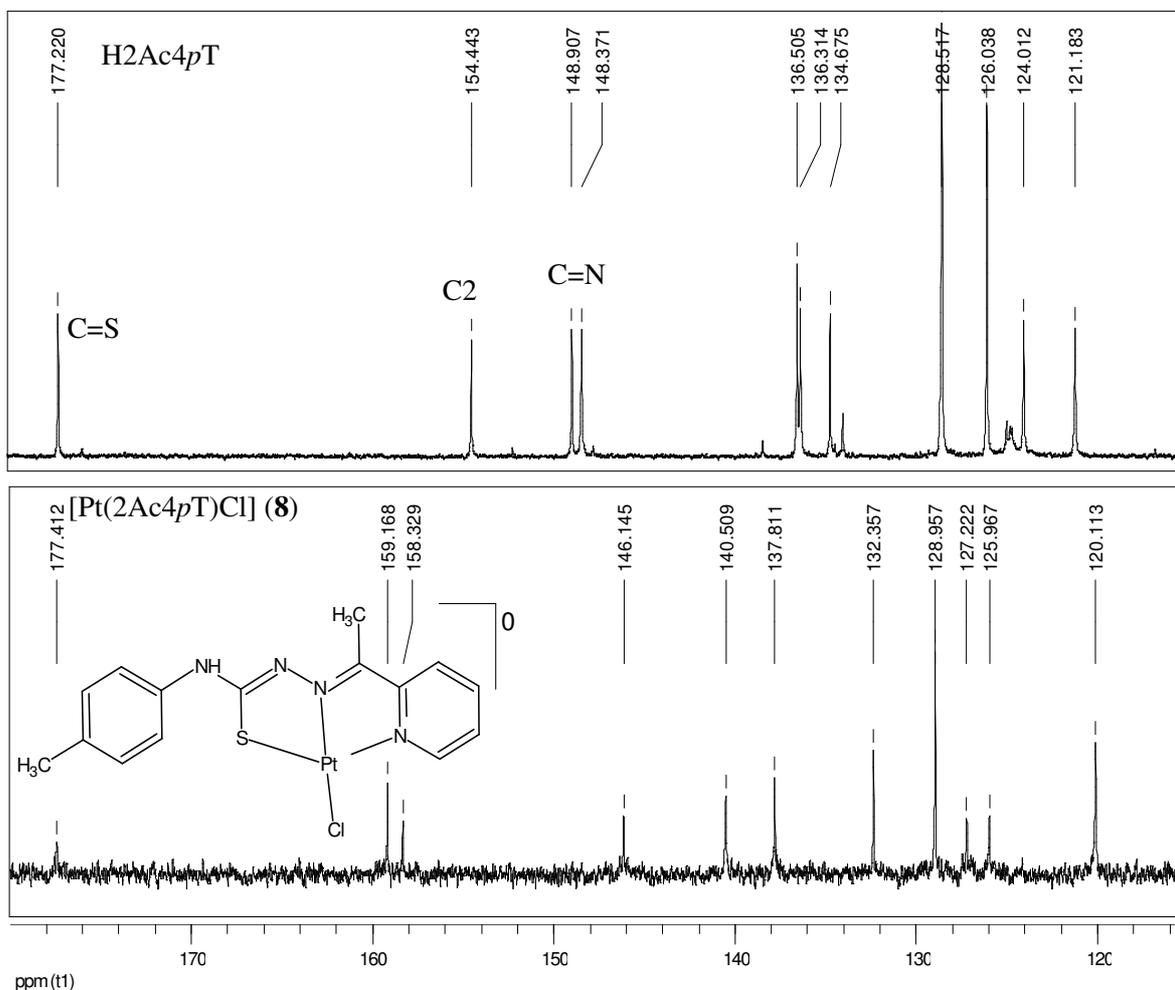
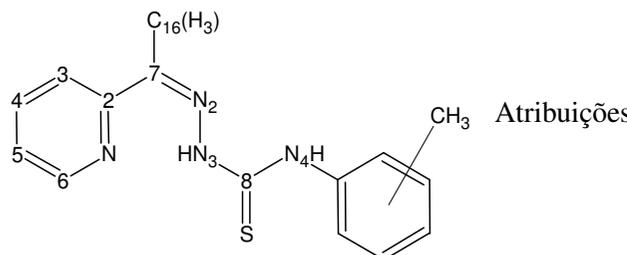


Figura 5.14 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na região entre 180-115 ppm de  $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{pT}$  e seu complexo  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4\text{pT})\text{Cl}]$  (**8**) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

Tabela 5.2.4 – Atribuições de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 dos complexos de platina(II, IV) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

								
Composto	C2	C3	C4	C5	C6	C7=N	C8=S	C16
DEPT 135	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	↑
<b>H2Ac4oT</b>	<b>154,59</b>	<b>121,11</b>	<b>136,23</b>	<b>123,93</b>	<b>148,36</b>	<b>148,58</b>	<b>177,90</b>	<b>12,55</b>
[Pt(H2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> ] (6)	152,19	125,89	138,27	126,30	146,09	156,45	181,62	13,20
[Pt(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> OH] (9)	156,13	124,93	140,13	127,92	146,39	156,50	173,06	12,75
<b>H2Ac4mT</b>	<b>154,51</b>	<b>121,25</b>	<b>136,52</b>	<b>124,11</b>	<b>148,46</b>	<b>149,70</b>	<b>177,15</b>	<b>12,49</b>
[Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl] (7)	156,16	123,98	137,74	127,40	146,23	159,15	-	13,79
[Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH](10)	156,69	123,99	137,75	127,41	146,47	159,16	177,61	13,81
<b>H2Ac4pT</b>	<b>154,52</b>	<b>121,19</b>	<b>136,31</b>	<b>124,02</b>	<b>148,42</b>	<b>148,97</b>	<b>177,26</b>	<b>12,47</b>
[Pt(2Ac4pT)Cl] (8)	158,33	120,11	137,81	127,22	146,14	159,17	177,41	13,76
[Pt(2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> OH] (11)	158,39	120,15	137,84	127,27	146,19	159,19	177,45	13,80

## 5.3- Cristalografia por Difração de Raios X

Foram determinadas as estruturas cristalográficas dos complexos [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**) e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**), obtidos por difusão lenta de [Pt(H2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>] (**6**) e [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**) em uma solução de DMSO/acetona. Durante o processo de cristalização em DMSO: acetona ocorre a perda de uma molécula de HCl em **6** e de uma molécula de água em **7** para a formação de **6a** e **7a**. Os resumos da coleção de dados e do refinamento<sup>22,23,24</sup> das estruturas encontram-se na Tabela 5.3.1. Na Figura 5.15 estão representados os diagramas moleculares dos complexos (**6a**) e (**7a**). Na Tabela 5.3.2 estão dispostos valores de distâncias e ângulos de ligação selecionados de **6a** e **7a**, bem como das tiossemicarbazonas livres (H2Ac4oT<sup>25</sup> e H2Ac4mT<sup>26</sup>), para comparação.

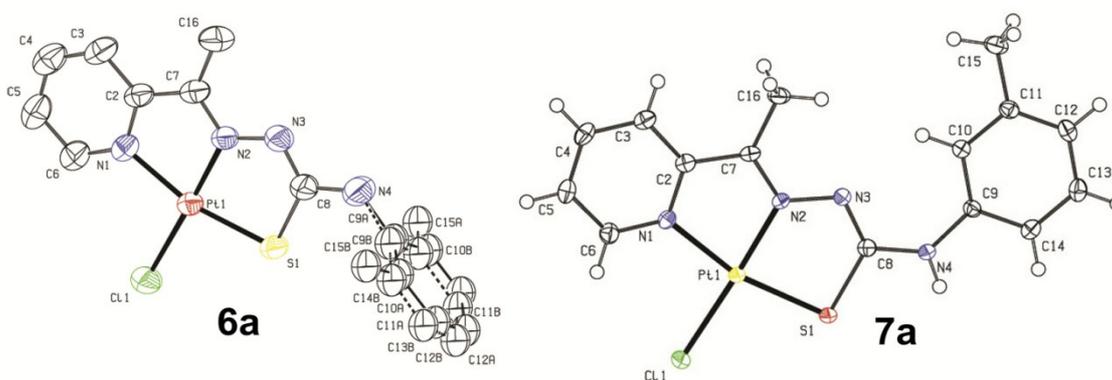


Figura 5.15 – Diagrama molecular dos complexos [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**) e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**). Em **6a** os átomos de hidrogênios foram omitidos para uma melhor visualização da desordem no grupo tolúil.

Os complexos (**6a**) e (**7a**) cristalizam-se com uma molécula independente por unidade assimétrica nos grupos espaciais  $P2_1/n$  e  $P\bar{1}$ , respectivamente. Esses complexos são formados por uma tiossemicarbazona coordenada em sua forma aniônica de modo tridentado–ao centro de platina(II) juntamente com um cloreto em uma ambiente quadrático.

Pela coordenação algumas modificações importantes são observadas nas estruturas das tiossemicarbazonas. Uma delas é a modificação na conformação em relação às ligações C7=N2 e N3-C8, que passa de *EE*, nas tiossemicarbazonas livres, para *EZ* nos complexos, possibilitando a formação do sistema tridentado N<sub>py</sub>-N-S. A mudança na conformação de *E* para *Z* em relação à ligação N3-C8

<sup>22</sup>G.M. Sheldrick, SHELXS-97; Program for the Solution of Crystal Structures; University of Göttingen, Germany (1997).

<sup>23</sup>G.M. Sheldrick, SHELXL-97; Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Germany (1997).

<sup>24</sup>L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst. 32 (1999) 837.

<sup>25</sup>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.

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

pode ser observada pela variação no ângulo diedro N2-N3-C8-S1 de 175,7(1) ° (em H2Ac4oT) e 172,0(2) ° (em H2Ac4mT) para 1,5(7) ° (em **6a**) e 0,4(3) ° (em **7a**), respectivamente. Do mesmo modo, a variação sofrida pelos ângulos N2-N3-C8 de 118,25(16) ° (em H2Ac4oT) e 118,5(2) ° (em H2Ac4mT) para 112,1(4) ° (em **6a**) e 112,4(2) ° (em **7a**); e N3-C8-S 120,83(14) ° (em H2Ac4oT) e 120,3(2) ° (em H2Ac4mT) para 126,1(4) ° (em **6a**) e 125,1(2) ° (em **7a**) evidencia a mudança conformacional de *E* para *Z* (ver tabela 5.3.2).

Tabela 5.3.1 – Resumo da coleção de dados e refinamento dos complexos [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**) e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**). Desvio padrão entre parênteses

Complexos	( <b>6a</b> )	( <b>7a</b> )
Fórmula empírica	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> ClPtS	
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	513,91	
Temperatura (K)	293(2)	150(2) K
Radiação, λ (Å)	0,71073	0,71073
Intervalo de θ (°)	2,74 a 26,37	2,58 a 32,91
Intervalos de hkl	-10 ≤ h ≤ 11 -11 ≤ k ≤ 11 -25 ≤ l ≤ 25	-11 ≤ h ≤ 11 -12 ≤ k ≤ 12 -19 ≤ l ≤ 19
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> /n	P $\bar{1}$
a (Å)	8,8087(12)	7,6653(2)
b (Å)	9,1654(13)	8,1208(4)
c (Å)	20,439(2)	13,0087(5)
α (°)	90	100,340(3)
β (°)	101,063(13)	101,448(3)
γ (°)	90	96,781(3)
Volume (Å <sup>3</sup> )	1619,5(4)	770,79(5)
F(000)	976	464
Z/ Densidade calculada (Mg m <sup>-3</sup> )	4 / 2,108	2/ 2,155
Coeficiente de absorção μ (mm <sup>-1</sup> )	8,958	9,409
Reflexões coletadas/ Reflexões únicas [R(int)]	14663/ 3300 [R(int) = 0,0649]	49856/ 5529 [R(int) = 0,0574]
Restrições/ Parâmetros refinados	0/ 187	0 / 199
R (all)	R <sub>1</sub> = 0,0384, wR <sub>2</sub> = 0,0600	R <sub>1</sub> = 0,0309, wR <sub>2</sub> = 0,0503
R [I > 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0,0266, wR <sub>2</sub> = 0,0578	R <sub>1</sub> = 0,0234, wR <sub>2</sub> = 0,0470
S	99,9 (a 26,37 °)	95,8 (a 32,91 °)
Δρ min/max (e.Å <sup>3</sup> )	0,914 e -0,585	1,770 e -0,913

Tabela 5.3.2 - Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de H2Ac4oT, [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**), H2Ac4mT e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	Distâncias (Å)			
	H2Ac4oT	( <b>6a</b> )	H2Ac4mT	( <b>7a</b> )
Pt-N2	-	1,948(4)	-	1,956(2)
Pt-N1	-	2,043(4)	-	2,041(2)
Pt-S	-	2,2566(13)	-	2,2601(7)
Pt-Cl	-	2,3105(13)	-	2,3110(7)
S-C8	1,6740(19)	1,764(5)	1,671(3)	1,767(3)
C2-C7	1,493(3)	1,446(7)	1,488(4)	1,467(4)
N2-C7	1,287(2)	1,309(6)	1,289(3)	1,308(3)
N2-N3	1,380(2)	1,369(6)	1,381(3)	1,382(3)
N3-C8	1,359(2)	1,309(6)	1,359(3)	1,305(4)
N4-C8	1,344(2)	1,352(7)	1,339(3)	1,356(4)
N4-C9	1,433(2)	1,43(2)	1,429(3)	1,415(3)
Átomos	Ângulos (°)			
C7-N2-N3	118,99(16)	119,4(4)	119,0(2)	119,0(2)
N2-N3-C8	118,25(16)	112,1(4)	118,5(2)	112,4(2)
N4-C8-N3	114,46(17)	116,9(5)	114,8(2)	120,4(3)
N4-C8-S	124,71(15)	117,0(4)	124,9(2)	114,5(2)
N4-C8-C9	127,09(17)	124,6(9)	125,7(2)	130,6(2)
N3-C8-S	120,83(14)	126,1(4)	120,3(2)	125,1(2)
N2-Pt-N1	-	80,56(16)	-	80,61(9)
N1-Pt-S	-	166,02(12)	-	165,35(7)
N2-Pt-S	-	85,61(12)	-	84,82(7)
N1-Pt-Cl	-	97,37(13)	-	96,77(7)
N2-Pt-Cl	-	177,94(12)	-	177,38(7)

Outra modificação é a extensão da conjugação com a formação do anel quelato envolvendo os átomos N2, N3, C8, S1 e Pt1. A ligação C8-S1 aumenta de 1,674(2) Å (em H2Ac4oT) e 1,673(4) Å (em H2Ac4mT), para 1,765(6) Å (em **6a**) e 1,768(3) Å (em **7a**), com a passagem da forma tiona (C=S) para a forma tiolato (C-S)<sup>27</sup>. A ligação C8-N3 diminui de 1,359(3) Å (em H2Ac4oT) e 1,360(3) Å (em H2Ac4mT) para 1,309(7) Å (em **6a**) e 1,305(3) Å (em **7a**), aumentando o caráter de dupla ligação.

Com relação à planaridade das tiossemicarbazonas livres e coordenadas podemos observar a presença de três planos: o da piridina (N1-C2-C3-C4-C5-C6), o do esqueleto da tiossemicarbazona (C7-N2-N3-C8-S1-N4) e o do anel do grupo tolúil (C9-C10-C11-C12-C13-C14). Na tabela 5.3.3 estão dispostos os valores dos desvios quadráticos médios dos átomos no plano e ângulos entre planos definidos para as estruturas de H2Ac4oT, [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**), H2Ac4mT e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**). O esqueleto C7-N2-N3-C8-S1-N4 é aproximadamente plano, tanto no ligante livre quanto nos complexos.

Grandes diferenças foram observadas nos ângulos entre os planos após a coordenação. Uma delas foi a diminuição do ângulo entre os planos do anel da piridina e do esqueleto da

<sup>27</sup> K.S.O. Ferraz, L. Ferandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.F. Leite, E.M. Souza-Fagundes, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo. Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7138.

tiossemicarbazona, o que reflete o aumento da planaridade associado à geometria imposta para a coordenação a platina(II).

A outra é a variação no ângulo entre os planos do grupo toluil e do esqueleto da tiossemicarbazona, que não estão associados num primeiro momento à coordenação, mas sim, a efeitos estéricos relacionados com a posição da metila no grupo toluil. Esta diferença leva a uma mudança do grupo espacial dos complexos. No caso de **6a**, o ângulo entre os planos do grupo toluil e do esqueleto da tiossemicarbazona aumentou de 71,3 ° (em H2Ac4oT) para 85,3 °, resultando num aumento na simetria do cristal. No caso de **7a**, esse ângulo diminui drasticamente de 65,4 ° (em H2Ac4mT) para 5,0 °, fazendo com que seu complexo seja quase planar. Esta estrutura é muito similar àquela obtida para [Cu(2Ac4mT)Cl]<sup>26</sup>, um complexo de cobre(II) com este mesmo ligante.

A tabela 5.3.3 mostra os desvios quadráticos médios dos átomos no plano e ângulos entre planos na estrutura de H2Ac4oT, [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**), H2Ac4mT e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**). Na Figura 5.16 estão representados os empacotamentos moleculares para **6a** e **7a**, revelando as ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo N4-H e S1. Em **6a** foi observada a interação N4-H $\cdots$ S, 0,86 Å d(D-H), 2,83 Å d(H $\cdots$ A), 170 ° (DHA) e 3,677(6) Å d(D $\cdots$ A) Å, levando à formação de cadeias infinitas. Em **7a**, a interação N4-H $\cdots$ S, 0,86 Å d(D-H), 2,66 Å d(H $\cdots$ A), 171 ° (DHA) e 3,514(3) Å d(D $\cdots$ A) Å leva à formação de dímeros.

Tabela 5.3.3 – Desvios quadráticos médios dos átomos no plano e ângulos entre planos nas estruturas de H2Ac4oT, [Pt(2Ac4oT)Cl] (**6a**), H2Ac4mT e [Pt(2Ac4mT)Cl] (**7a**)

Átomos que definem o plano	Desvios quadráticos médios dos átomos no plano (Å)	Ângulo entre planos (°)	
<b>H2Ac4oT</b>			
N1-C2-C3-C4-C5-C6	0,0038	12,9	-
C7-N2-N3-C8-S1-N4	0,0227		71,3
C9-C10-C11-C12-C13-C14	0,0037	-	
<b>6a</b>			
N1-C2-C3-C4-C5-C6	0,0078	5,8	-
C7-N2-N3-C8-S1-N4	0,0248		85,3
C9-C10-C11-C12-C13-C14	0,0063	-	
<b>H2Ac4mT</b>			
N1-C2-C3-C4-C5-C6	0,0021	17,2	-
C7-N2-N3-C8-S1-N4	0,0591		65,4
C9-C10-C11-C12-C13-C14	0,0031	-	
<b>7a</b>			
N1-C2-C3-C4-C5-C6	0,0034	2,9	
C7-N2-N3-C8-S1-N4	0,0110		5,0
C9-C10-C11-C12-C13-C14	0,0032	-	

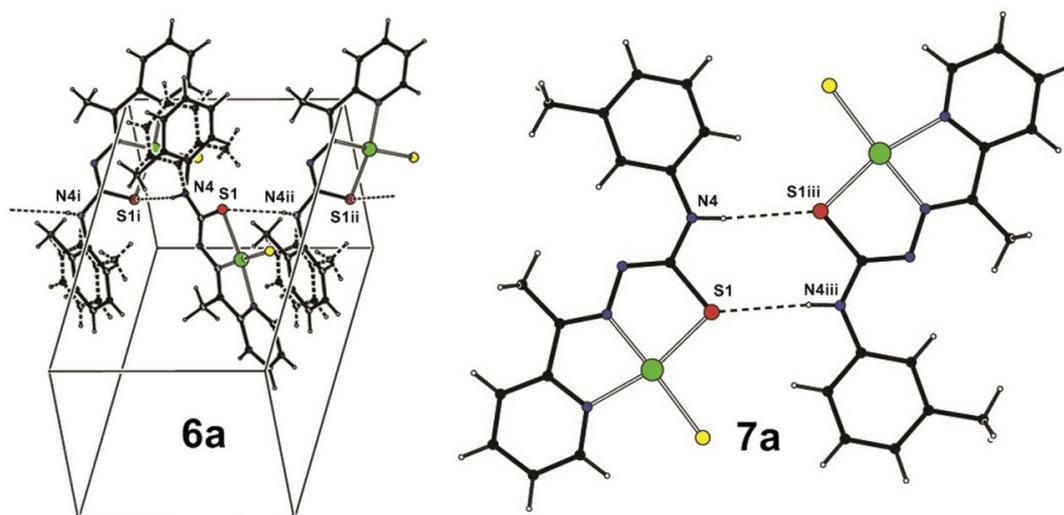


Figura 5.16 – Diagramas de empacotamento molecular dos complexos  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}]$  (**6a**) e  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}]$  (**7a**).

#### 5.4 – Atividade Citotóxica

##### 5.4.1 – Investigação da atividade citotóxica dos complexos de platina (II, IV) em linhagens celulares de tumores sólidos MCF-7, e de leucemias HL60 e Jurkat

Estudos preliminares do efeito citotóxico das tiossemicarbazonas livres e seus complexos de platina(II, IV) foram realizados contra a linhagem de células de tumor sólido adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e contra leucemias HL60 e Jurkat. Os efeitos das tiossemicarbazonas e seus complexos de platina(II, IV) sobre a proliferação celular (em porcentagem em relação ao controle) nas diferentes linhagens estão mostrados na figura 5.17.

As tiossemicarbazonas livres foram mais ativas que os seus complexos e que a cisplatina contra células MCF-7.  $\text{H}2\text{Ac}4p\text{T}$  foi a mais ativa da série. Os complexos de platina(IV)  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$  (**9**),  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$  (**10**) e  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$  (**11**) foram mais ativos que seus análogos de platina(II)  $[\text{Pt}(\text{H}2\text{Ac}4o\text{T})\text{Cl}_2]$  (**6**),  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$  (**7**) e  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4p\text{T})\text{Cl}]$  (**8**), sendo o complexo (**9**) o mais ativo dentre eles.

Compostos de platina(IV) são inertes e por isso permanecem mais tempo intactos dentro da célula, impedindo a formação de outras espécies. Além disso, esses compostos podem sofrer redução por meio de biomoléculas endógenas como o ascorbato e a glutatona, e a diminuição do nível de glutatona dentro da célula provoca diminuição da resistência celular. Assim, a porção ativa dentro da célula é aquela que sofre redução à platina(II).

Observa-se que todas as tiossemicarbazonas livres foram mais ativas que os seus complexos contra células HL-60;  $\text{H}2\text{Ac}4o\text{T}$  e  $\text{H}2\text{Ac}4m\text{T}$  foram também mais ativas que a cisplatina. A atividade citotóxica entre as tiossemicarbazonas segue a ordem  $\text{H}2\text{Ac}4o\text{T} > \text{H}2\text{Ac}4m\text{T} > \text{H}2\text{Ac}4p\text{T}$ .

Os complexos de platina(II, IV) não apresentaram diferenças significativas de atividade citotóxica, sendo todos eles menos ativos que a cisplatina (ver figura 5.19). Portanto, a coordenação à platina não foi uma estratégia interessante para aumentar a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas contra linhagem celular HL60.

Interessantemente todos os complexos foram mais ativos que as tiossemicarbazonas livres contra células de leucemia Jurkat, exceto o complexo [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (**10**). Nesse caso, não é possível estabelecer uma relação estrutura/atividade e nem com o estado de oxidação do metal.

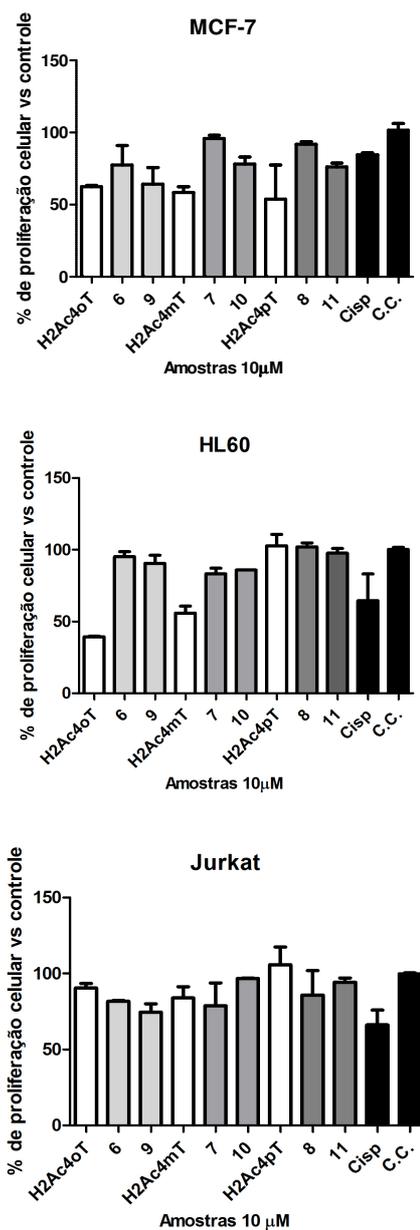


Figura 5.17 – Efeito H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT e seus complexos de platina(II) [Pt(H2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>] (**6**), [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**) e [Pt(2Ac4pT)Cl] (**8**) e de platina(IV) [Pt(2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>OH] (**9**), [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (**10**) e [Pt(2Ac4pT)Cl<sub>2</sub>OH] (**11**) sobre a proliferação de células MCF-7, HL-60 e Jurkat.

#### 5.4.2 – Investigação da atividade citotóxica dos complexos de platina (II, IV) e de ouro(I, III) em linhagens de glioblastoma U87 e T98

Os complexos de platina(II, IV) juntamente com os de ouro(I, III) também foram testados contra o crescimento de células glioblastomas humanos U-87 (que expressam a proteína p53 selvagem) e T-98 (que expressam p53 mutante). As tabelas 5.4.1 e 5.4.2 mostram os valores de  $CI_{50}$  (concentração em que ocorre 50% de morte celular) para as tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro(I, III) e platina(II, IV).

As tiossemicarbazonas se mostraram altamente citotóxicas contra glioblastomas com valores de  $CI_{50}$  entre 0,021-2,729  $\mu\text{M}$  contra células U-87 e 0,003-0,452  $\mu\text{M}$  contra células T-98, sendo mais ativas que os fármacos utilizados como referência, a cisplatina (fármaco antitumoral) e a auranofina, fármaco usado na clínica contra artrite reumatóide e que tem demonstrado alta atividade citotóxica.<sup>28,29</sup>

Entre os complexos de ouro,  $[\text{Au}(\text{2Ac4oT})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$  (**2**) foi o mais ativo contra as duas linhagens de células ( $CI_{50} = 0,032$  e  $0,076 \mu\text{M}$ ) e mostrou-se também mais ativo que o sal de partida, a cisplatina e auranofina. O composto foi, no entanto, ligeiramente mais ativo que a tiossemicabazona livre apenas contra as células U-87.

Com a coordenação, a atividade citotóxica melhorou cerca de 10 vezes nos casos dos complexos  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Fo4pT})\text{Cl}]$  (**1**) e  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Ac4mT})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**3**) contra as células U-87, com valores de  $CI_{50}$  passando de 1,428 e 2,729  $\mu\text{M}$  nas tiossemicabazonas para 0,193 e 0,321  $\mu\text{M}$  nos complexos, respectivamente, sugerindo que a coordenação melhorou a atividade citotóxica nesses casos. Esse aumento de atividade pode estar relacionado com fatores de biodisponibilidade associados ao complexo. Todos os complexos de ouro foram mais ativos que o sal de partida e que a cisplatina contra as células U-87.  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Fo4pT})\text{Cl}]$  (**1**) e  $\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Ac4pT})\text{Cl}_2\text{Cl}$  (**4**) exibiram atividade citotóxica semelhante a da auranofina, enquanto que os complexos  $[\text{Au}(\text{2Ac4oT})\text{Cl}][\text{AuCl}_2]$  (**2**) e  $\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Bz4pT})\text{Cl}_2\text{Cl}\cdot\text{2HCl}$  (**5**) foram aproximadamente quatro vezes mais ativos que a auranofina contra células U-87.

O complexo  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Fo4pT})\text{Cl}]$  (**1**) foi cerca de duas vezes mais ativo que a tiossemicarbazona contra as células T-98, mostrando a eficácia da coordenação. Todos os complexos foram mais ativos que o sal de ouro, a auranofina e a cisplatina contra o crescimento de células T-98. De uma forma geral, os diferentes modos de coordenação não revelaram diferenças significativas na atividade, pois o próprio ligante apresenta alta atividade citotóxica.

A citotoxicidade dos compostos também foi avaliada contra células sadias de fibroblastos de pulmão de feto humano (MRC-5). Em geral, os valores de índice terapêutico  $[\text{IT} = CI_{50}(\text{MRC-5})/CI_{50}(\text{células tumorais})]$  para todos os compostos foram muito baixos, inclusive para os fármacos de

<sup>28</sup> A.G. Cox, K.K. Brown, E.S.J. Arner, M.B. Hampton, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1097.

<sup>29</sup> C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M. P. Rigobello, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 872.

referência. Os complexos (**1**) e (**5**) foram muito mais ativos que a cisplatina contra as células U-87, e com valores de IT semelhantes (IT = 2,87), revelando maior eficácia desses compostos em relação à cisplatina. Comparando o efeito de **1** e **5** ao da auranofina, **1** revelou ser tão ativo quanto a auranofina, porém menos tóxico, enquanto que **5** foi muito mais ativo e menos tóxico, concomitantemente.

Os compostos H2Fo4pT, **1** e **4** foram mais ativos que os fármacos de referência contra as células T-98, com valores superiores de índices terapêuticos (TI = 3,37 (H2Fo4pT); 3,04 (**1**); 2,49 (**4**); 0,95 (cisplatina); 0,05 (auranofina), sugerindo uma melhor potência desses compostos como candidatos a protótipos de fármacos.

Na figura 5.18 encontram-se as fotomicrografias das células T-98 e U-87 tratadas com H2Ac4oT (tiossemicarbazona mais potente) e seu complexo [Au(2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>][AuCl<sub>2</sub>] (**2**), com H2Fo4pT (tiossemicarbazona menos potente) e seu complexo [Au(H<sub>py</sub>2Fo4pT)Cl] (**1**), com a auranofina e o sal H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, todos a 1 μM. Alterações como o encolhimento celular, formas arredondadas e formação de vesículas sugerem a indução da morte celular programada (apoptose). As características que aparecem nas micrografias sugerem que essa série de ligantes bem como seus complexos de ouro provocam a morte celular por apoptose.

Nosso grupo de pesquisa tem investigado o mecanismo de ação de tiossemicarbazonas *N*-(4)-substituídas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina demonstrando a capacidade desses compostos em ativar mecanismos apoptóticos de morte celular.<sup>25,30</sup>

Tabela 5.4.1- Valores de CI<sub>50</sub> para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos de ouro(I, III)

Composto	CI <sub>50</sub> ± 95 % de intervalo de confiança (μM)		
	U-87	T-98	MRC-5
<b>H2Fo4pT</b>	<b>1,428 ± 0,171</b>	<b>0,45 ± 0,03</b>	<b>1,523 ± 0,065</b>
[Au(H <sub>py</sub> 2Fo4pT)Cl] ( <b>1</b> )	0,19 ± 0,01	0,182 ± 0,004	0,554 ± 0,007
<b>H2Ac4oT</b>	<b>0,042 ± 0,002</b>	<b>0,003 ± 0,001</b>	<b>0,00898 ± 0,00001</b>
[Au(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> ][AuCl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> )	0,032 ± 0,002	0,076 ± 0,001	0,014 ± 0,012
<b>H2Ac4mT</b>	<b>2,729 ± 0,550</b>	<b>0,057 ± 0,006</b>	<b>0,066 ± 0,012</b>
[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·H <sub>2</sub> O ( <b>3</b> )	0,321 ± 0,050	0,33 ± 0,02	0,062 ± 0,011
<b>H2Ac4pT</b>	<b>0,051 ± 0,006</b>	<b>0,12 ± 0,01</b>	<b>0,012 ± 0,002</b>
[Au(H <sub>py</sub> 2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl ( <b>4</b> )	0,25 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,28 ± 0,12
<b>H2Bz4pT</b>	<b>0,021 ± 0,005</b>	<b>0,13 ± 0,04</b>	<b>0,006 ± 0,002</b>
[Au(H <sub>py</sub> 2Bz4pT)Cl <sub>2</sub> ]Cl·2HCl ( <b>5</b> )	0,038 ± 0,006	0,13 ± 0,01	0,1100 ± 0,0004
H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub>	> 100	> 100	4,347 ± 0,787
Auranofina	0,188 ± 0,009	5,6 ± 0,6	0,303 ± 0,024
Cisplatina	1,76 ± 0,22	5,31 ± 1,94	5,05 ± 0,71

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

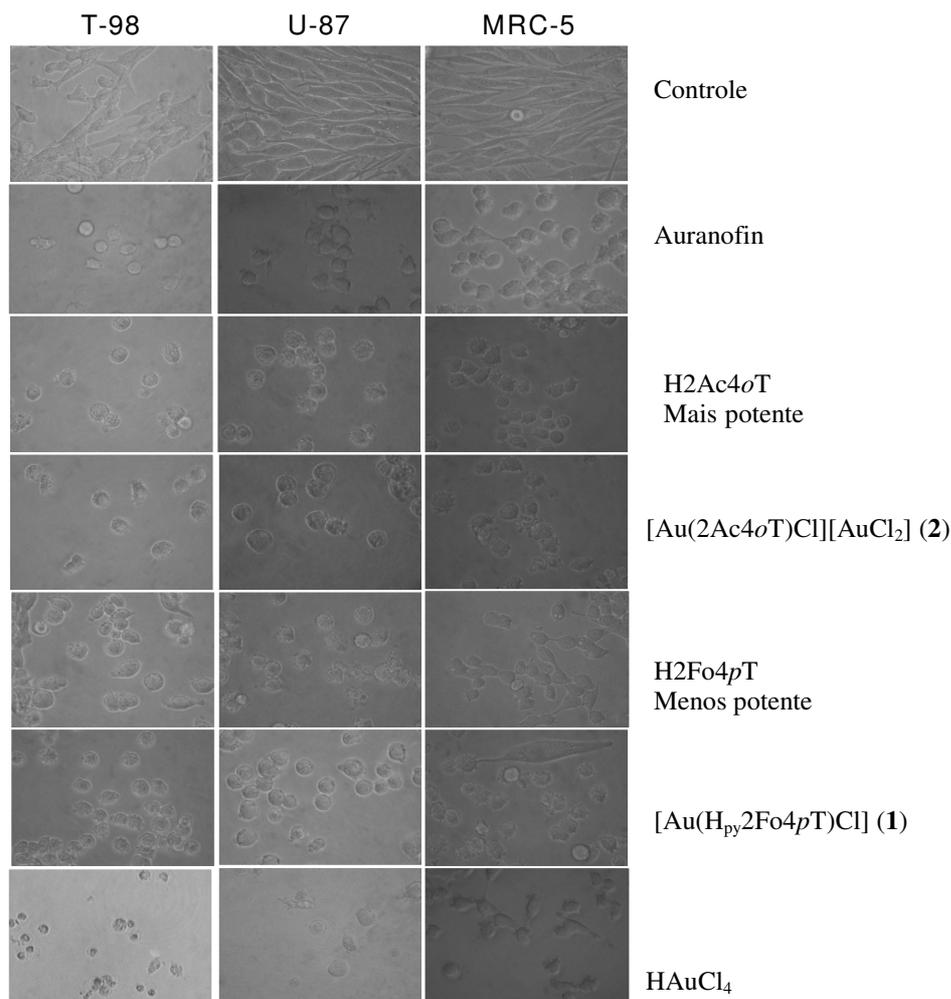


Figura 5.18 - Alterações morfológicas induzidas por tratamento com tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro ( $1\mu$ ): fotomicrografias de células de glioblastoma (T-98 e U-87) e células MRC-5.

Os complexos de platina(II, IV) foram menos ativos que seus análogos de ouro(I, III) contra as duas linhagens de células U-87 e T-98. De um modo geral, os complexos de platina(IV) foram mais ativos que seus análogos de platina(II), exceto no caso dos complexos [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (7) e [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (10), em que 7 foi duas vezes mais ativo que 10.

A presença do ligante hidróxido poderia favorecer uma menor velocidade de redução da platina(IV), permitindo um maior tempo do composto intacto antes de atingir o alvo<sup>31</sup>. Os complexos (7) e (10) foram mais ativos que a tiossemicarbazona correspondente, mostrando que a coordenação a platina(II) e a platina(IV) nesse caso foi eficaz para aumentar a citotoxicidade contra as duas linhagens de células de glioblastomas.

Todos os complexos de platina foram mais ativos que seus respectivos sais precursores contra as duas linhagens de células. Os também foram mais ativos que a cisplatina contra as células T-98, com exceção de [Pt(H2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>] (6) e [Pt(2Ac4pT)Cl] (8), contra as células T-98).

<sup>31</sup> M.D. Hall, T.W. Hambley, Coord. Chem. Rev. 232 (2002) 49.

Não foram observadas diferenças significativas entre as atividades das tiossemicarbazonas livres, entre aquelas dos complexos de platina(II) e entre as dos complexos de platina(IV) contra as linhagens U-87 e T-98. Esse resultado revela que o mecanismo de ação desses compostos é independente da ação pró-apoptótica da p53.

Todos os complexos de platina(II, IV) mostraram-se altamente citotóxicos contra células saudáveis. O complexo [Pt(H2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>] (**6**) mostrou-se menos tóxico com valores de IT = 1,6 (U-87) e IT = 1,2 (T-98) que apesar de serem baixos podem ser comparados a cisplatina que também exibiu baixos valores de IT (2,9 para U-87 e 0,9 para T-98).

Tabela 5.4.2 - Valores de CI<sub>50</sub> para as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de platina(II, IV)

Composto	CI <sub>50</sub> ± 95 % de intervalo de confiança (µM)		
	U-87	T-98	MRC-5
<b>H2Ac4oT</b>	<b>0,042 ± 0,002</b>	<b>0,003 ± 0,001</b>	<b>0,00898 ± 0,00001</b>
[Pt(H2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	4,7 ± 1,4	6,6 ± 1,9	7,7 ± 1,7
[Pt(2Ac4oT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>9</b> )	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,73 ± 0,07
<b>H2Ac4mT</b>	<b>2,7 ± 0,6</b>	<b>0,07 ± 0,01</b>	<b>0,0662 ± 0,0007</b>
[Pt(2Ac4mT)(H <sub>2</sub> O)Cl] ( <b>7</b> )	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,74 ± 0,02
[Pt(2Ac4mT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>10</b> )	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,21 ± 0,07
<b>H2Ac4pT</b>	<b>0,051 ± 0,006</b>	<b>0,012 ± 0,002</b>	<b>0,012 ± 0,002</b>
[Pt(2Ac4pT)Cl] ( <b>8</b> )	29 ± 11	38 ± 13	16,5 ± 0,7
[Pt(2Ac4pT)Cl <sub>2</sub> OH] ( <b>11</b> )	3,1 ± 0,8	4,0 ± 1,2	2,6 ± 0,2
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	122 ± 40	129 ± 58	68,9 ± 5,3
K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	32 ± 12	34 ± 21	73,5 ± 8,9
Cisplatina	1,76 ± 0,22	5,31 ± 1,94	5,1 ± 0,7

#### 5.4.3 – Avaliação do mecanismo de ação citotóxica

##### 5.4.3.1- Inibição da atividade enzimática da Tiorredoxina redutase (TrxR)

A inibição da atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) poderia ser um modo de ação dos complexos aqui estudados. TrxR está envolvida em uma das etapas de biosíntese do ADN<sup>32,33</sup> e a literatura relata que complexos de diferentes metais, em particular os de ouro, provocam a inibição da atividade catalítica da TrxR.<sup>34,35</sup>

A tiossemicarbazona H2Ac4mT, seu complexo de ouro(III) [Au(H<sub>py</sub>2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>]Cl·H<sub>2</sub>O (**3**), os complexos de platina(II) [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**) e de platina(IV) [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (**10**) e os sais de partida HAuCl<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> foram avaliados quanto a capacidade de inibição da

<sup>32</sup> C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M.P. Rigobello, Free Radical Biol. Med. 42 (2007) 872.

<sup>33</sup> R. Rubbiani, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, A. Kitanovic, L.A. Onambele, M. Stefanopoulou, Y. Geldmacher, W.S. Sheldrick, G.A. Prokop, S. Wölfl, I. Ott, J. Med. Chem. 53 (2010) 8608.

<sup>34</sup> E.R.T. Tiekink, Inflammopharmacology 16 (2008) 138.

<sup>35</sup> J.A. Lessa, K.S.O. Ferraz, J.C. Guerra, L.F. de Miranda, C.F.D. Romeiro, E.M. Souza-Fagundes, P.J.S. Barbeira, H. Beraldo, Biometals 25 (2012) 587.

atividade da enzima TrxR a 10  $\mu\text{M}$ , utilizando como controle a auranofina e cisplatina (Figura 5.19). Verifica-se que nessa concentração a tiossemicarbazona livre, e os complexos de platina(II)  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$  (7) e (IV)  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$  (10) e seus sais inibem 11-15 % da atividade da enzima TrxR, enquanto que o complexo de ouro(III)  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (3) inibe cerca de 75 %. O sal de ouro e a auranofina inibem cerca de 90 % da atividade enzimática.

Esses resultados indicam que a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas livres, dos complexos de ouro e seus análogos de platina(II, IV) envolve diferentes mecanismos de ação, já que todos os compostos foram ativos contra as células de glioblastomas em concentrações menores do que a utilizada neste teste (10  $\mu\text{M}$ ). O uso de cisplatina e auranofina como controles ajudam na investigação dos resultados.

De fato, o mecanismo de ação citotóxica da cisplatina é bastante discutido na literatura<sup>36,37</sup>. Após processos de hidrólise no interior da célula a cisplatina sofre diferentes tipos de interação com o ADN, interferindo em sua síntese e posteriormente levando à morte celular<sup>38,39</sup>. No entanto, as atividades citotóxicas da auranofina e de outros complexos de ouro têm sido atribuídas à alta afinidade pela enzima TrxR, provocando a inibição em sua atividade e, conseqüentemente impedindo a síntese do ADN<sup>33</sup>. Já as tiossemicarbazonas são conhecidas por inibir a atividade da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), envolvida na biosíntese do ADN.<sup>40</sup>

Portanto, o principal mecanismo de ação dos complexos de platina(II, IV) pareceria não envolver a inibição de TrxR enquanto que aquele dos complexos de ouro deve envolver a inibição da atividade da TrxR.

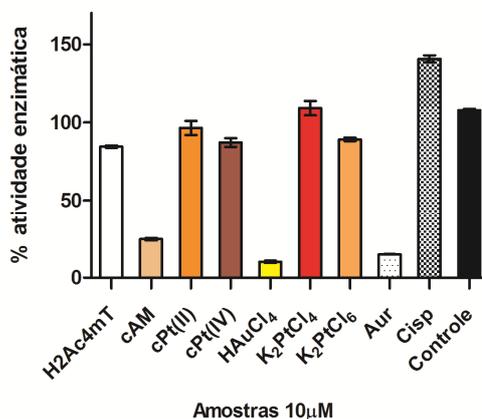


Figura 5.19 – Efeito inibitório de H2Ac4mT,  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (cAM),  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$  (cPt(II)),  $[\text{Pt}(2\text{Ac}4m\text{T})\text{Cl}_2\text{OH}]$  (cPt(IV)), H2AuCl4, K2PtCl4, K2PtCl6, auranofina e cisplatina na TrxR. A TrxR (0,10 unid) foi incubada com os compostos a 10  $\mu\text{M}$  por 1 h a 37 °C.

<sup>36</sup> C. Mock, I. Puscasu, M.J. Rauterkus, G. Tallen, J.E.A. Wolff, B. Krebs, Inorg, Chim. Acta 319 (2001) 109.

<sup>37</sup> S. Ahmad, Chem. Biodivers. 7 (2010) 543.

<sup>38</sup> B. Desoize, Anticancer Res. 24 (2004) 1529.

<sup>39</sup> Y. Jung, S.J. Lippard, Chem. Rev. 107 (2007) 387.

<sup>40</sup> 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.

## 5.4.3.2 – Interação com ADN plasmidial

H2Ac4mT, seu complexo de ouro(III) [Au(H<sub>py</sub>2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>]Cl·H<sub>2</sub>O (**3**), de platina(II) [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**) e de platina(IV) [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (**10**) e os seus respectivos sais de partida foram avaliados quanto à interação com ADN plasmidial. Foram usados os mesmos compostos do estudo da inibição da atividade da TRxR, usando novamente a auranofina e cisplatina como controles. A figura 5.20 exibe a eletroforese em gel de agarose utilizando ADN-pUC19 tratado com os diferentes compostos.

Na concentração de 200 μM, a tiossemicarbazona H2Ac4mT, seu complexo de ouro(III), o sal H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> e a auranofina não interagiram com o ADN, indicando que o ADN não seria o principal alvo da ação citotóxica desses compostos.

Na mesma concentração os complexos de platina(II) [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (**7**) e de platina(IV) [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (**10**) interagem fortemente com o ADN dificultando sua mobilidade através do gel de agarose. A cisplatina interagiu significativamente com o ADN, modificando sua mobilidade eletroforética. Já os sais de platina(II, IV) interagiram fracamente com o ADN.

Esses resultados colaboram com aqueles observados no estudo da inibição atividade da TrxR. O mecanismo de ação citotóxica dos compostos de platina pode ter como alvo principal o ADN, enquanto que os compostos de ouro agem majoritariamente pela inibição da enzima TrxR. O modo de ação da tiossemicarbazona livre provavelmente ocorre através da inibição da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, mecanismo de ação proposto para as tiossemicarbazonas α(N)-heterocíclicas.<sup>39,41</sup>

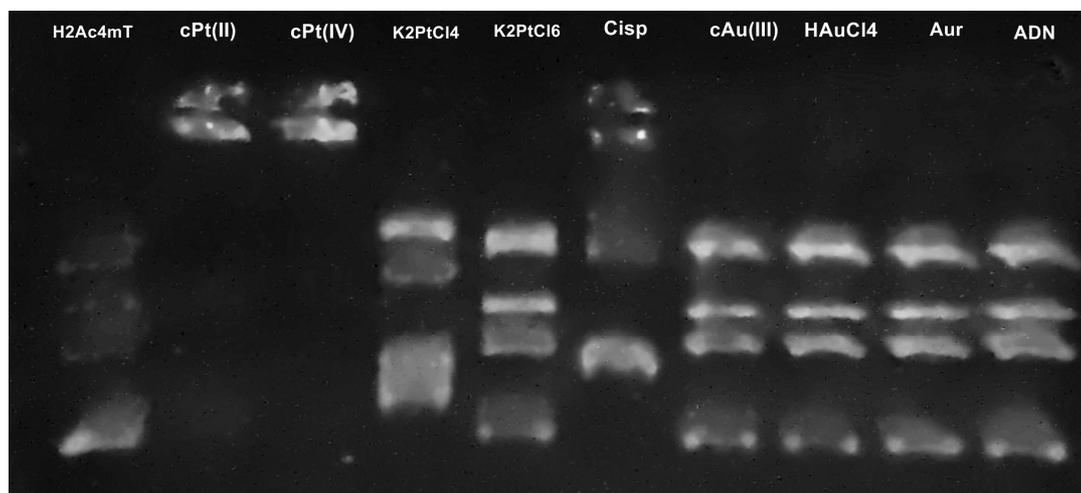


Figura 5.20 – Eletroforese em gel de agarose gel do ADN plasmidial pUC 19 tratado com os compostos H2Ac4mT, [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] (cPt(II)), [Pt(2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>OH] (cPt(IV)), K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>, cisplatina (Cisp), [Au(H<sub>py</sub>2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>]Cl·H<sub>2</sub>O (cAu(III)), H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> e auranofina (Aur) a 200 μM em tampão Tris–HCl (NaCl 50 mM, Tris–HCl 5 mM, pH 7.2) incubado a 37 °C por 24 h.

<sup>41</sup> I. Gojo, M.L. Tidwell, J. Greer, N. Takebe, K. Seiter, M.F. Pochron, B. Johnson, M. Sznol, J.E. Karp, Leuk. Res. 31 (2007) 1165.

## ***Investigação do perfil farmacológico de complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de bis(fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina***

Hidrazonas são compostos que contêm o grupo C=N-N e são obtidos a partir de reações de condensação entre derivados de hidrazina e compostos carbonílicos. Hidrazonas e seus derivados apresentam inúmeras aplicações farmacológicas como agentes antimicrobianos, anticonvulsivantes, analgésicos, antiinflamatórios, antiepiléticos, antituberculose e antitumorais.<sup>1</sup>

*Bis*(hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina são moléculas versáteis frente a diferentes íons metálicos e podem atuar como ligantes tetra ou mesmo pentadentados, de grande capacidade quelante<sup>2,3</sup>. Uma das potenciais aplicações de tais ligantes seria na remoção de metais de cérebros de pacientes com o mal de Alzheimer, os quais, acredita-se, acumulam metais como cobre(II), zinco(II) e ferro(III). Por outro lado, uma vez que *bis*(tiossemicarbazonas) e seus complexos com diferentes metais revelaram-se bons agentes citotóxicos contra diferentes linhagens de células tumorais<sup>4</sup>, parece-nos interessante investigar *bis*(hidrazonas) análogas e seus complexos metálicos.

Compostos antimoniais têm sido amplamente utilizados por várias décadas para o tratamento da leishmaniose. Nos últimos anos compostos de antimônio(III) e antimônio(V) também vêm despertando a atenção devido à sua potencial atividade antitumoral e antibacteriana.<sup>5</sup>

Compostos de bismuto são usados clinicamente contra *Helicobacter pylori*. Complexos de bismuto(III) têm-se mostrado ativos e seletivos como agentes antimicrobianos. Além disso, estudos mostram que compostos de bismuto apresentam atividade como agentes antitumorais.<sup>6</sup>

Nesta parte do trabalho complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6- diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazona) e seus derivados *bis*(*para*-clorofenil) e *bis*(*para*-nitrofenil) foram preparados a fim de se estudar o perfil farmacológico desses compostos.

---

<sup>1</sup> F.R. Pavan, P. I.S. Maia, S.R.A. Leite, V. M. Deflon, A. A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.F. Leite, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 1898.

<sup>2</sup> M. Carcelli, P. Mazza, C. Pelizzi, G. Pelizzi, F. Zani, J. Inorg. Biochem. 57 (1995) 43.

<sup>3</sup> L.D. Popov, A.N. Morozov, I.N. Shcherbakov, Y.P. Tupolova, V.V. Lukov, V.A. Kogan, Rus. Chem. Rev. 78 (2009) 643.

<sup>4</sup> H. Beraldo, Quim. Nova 27 (2004) 461.

<sup>5</sup> S. Rath, L.A. Trivelin, T.R. Imbrunito, D.M. Tomazela, M.N. Jesús, P.C. Marzal, Quim. Nova 26 (2003) 550.

<sup>6</sup> E.R.T. Tiekink, Critic. Rev. Onc. Hematol. 42 (2002) 217-224.

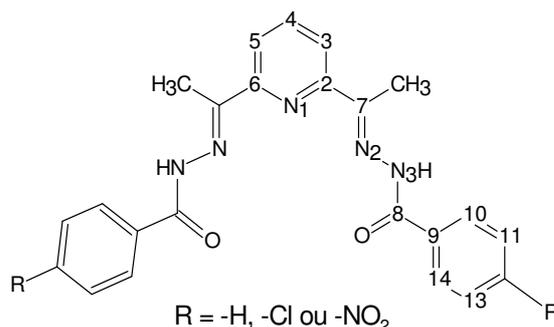


Figura 6.1 - Estrutura geral de 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazona) e seus derivados *bis*(*para*-clorofenil) (H<sub>2</sub>AcpClPh) e *bis*(*para*-nitrofenil) (H<sub>2</sub>AcpNO<sub>2</sub>Ph).

### 6.1 - Análises dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazona), *bis*(*para*-clorofenilhidrazona) e *bis*(*para*-nitrofenilhidrazona)

Os compostos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade molar, temperaturas de fusão e por meio de seus espectros no infravermelho, eletrônico e de ressonância magnética nuclear (RMN).

Tabela 6.1.1 – Dados analíticos obtidos para complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de *bis*(fenilhidrazonas)

Composto	Cor	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Λ <sub>M</sub> <sup>a</sup>	Análise Elementar (%) <sup>b</sup>			Temp. de fusão <sup>c</sup> °C
				C	H	N	
1 [Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ]	Amarela	678,32	10,31	40,49 (40,72)	2,84 (2,97)	10,38 (10,32)	>300 (236-237)
2 [Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ]	Alaranjada	591,10	25,48	46,74 (46,73)	3,21 (3,41)	11,82 (11,85)	dec >123 (236-237)
3 [Bi(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ]	Amarela	747,21	9,07	36,97 (36,97)	2,39 (2,43)	9,10 (9,37)	>300 (263-270)
4 [Sb(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ]	Amarela	659,99	21,06	42,15 (41,92)	2,58 (2,60)	10,72 (10,63)	>300 (263-270)
5 [Bi(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ]	Amarela	767,31	39,61	36,20 (35,95)	2,34 (2,36)	11,96 (12,76)	>300 (262-263)
6 [Sb(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ]	Amarela	681,10	27,97	40,51 (40,56)	2,62 (2,66)	14,31 (14,40)	dec >240 (262-263)

<sup>a</sup> Valores teóricos entre parênteses; <sup>b</sup> Λ<sub>M</sub>: (Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>) DMF~1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> Pontos de fusão das *bis*(fenilhidrazonas) entre parênteses. Dec: decompõe.

Os resultados de análise elementar e as condutividades molares indicam a formação de complexos neutros com razão molar 1:1 metal/ligante, contendo a *bis*(fenilhidrazona) com um dos nitrogênios N2 protonado e outro desprotonado, além de dois ligantes cloretos na esfera de coordenação, ou seja, compostos do tipo [M(HL)Cl<sub>2</sub>].

*Espectroscopia no Infravermelho*

As atribuições das bandas no espectro infravermelho das *bis*(fenilhidrazonas) e de seus complexos estão apresentadas na tabela 6.1.2. Nos espectros das *bis*(hidrazonas) livres, na região acima de 3000 cm<sup>-1</sup>, aparece uma banda de intensidade média, característica do estiramento N-H, a qual permanece nos espectros dos complexos. Na região entre 1671-1664 cm<sup>-1</sup> aparece uma banda intensa e larga nos espectros das *bis*(fenilhidrazonas), atribuída aos dois estiramentos  $\nu(\text{C}=\text{O})$ <sup>7</sup>. Com a coordenação, aparece uma única banda fina atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  na região entre 1686-1645 cm<sup>-1</sup>, sugerindo a coordenação pelo átomo de oxigênio. Após a coordenação, a vibração atribuída ao estiramento  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  em 1267-1247 cm<sup>-1</sup> nos espectros das *bis*(fenilhidrazonas) desloca-se para 1274-1250 cm<sup>-1</sup> nos espectros dos complexos (**1-6**), indicando a presença de uma ligação N-H, como foi sugerido anteriormente pelos dados de análise elementar e as medidas de condutividade molar.

As absorções atribuídas aos estiramentos  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  e  $\nu(\text{C}=\text{O})$  desaparecem nos espectros dos cristais **4a** e **5a**, obtidos após a recristalização de **4** e **5** em uma solução 1:9 DMSO/acetona, indicando total desprotonação das *bis*(fenilhidrazonas).

Nos espectros das *bis*(fenilhidrazonas) aparece uma banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{N})$  entre 1576-1568 cm<sup>-1</sup>, que desloca-se para a região entre 1525-1514 cm<sup>-1</sup> nos complexos, indicando a coordenação através do nitrogênio imínico<sup>8,9</sup>. A banda atribuída ao modo composto  $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{N}_{\text{py}})$ , que aparece entre 1530-1519 cm<sup>-1</sup> nos ligantes livres desloca-se para a região entre 1525-1482 cm<sup>-1</sup> nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação através do nitrogênio da piridina<sup>10</sup>. O deslocamento da banda atribuída ao modo de deformação do anel da piridina no plano, em 660-634 cm<sup>-1</sup> nos espectros das *bis*(fenilhidrazonas) aparece entre 691-660 cm<sup>-1</sup> nos espectros dos complexos, o que confirma a coordenação através do nitrogênio heteroaromático.<sup>11</sup>

O surgimento de novas bandas nas regiões entre 519-469 cm<sup>-1</sup>, 385-335 cm<sup>-1</sup>, 256-246 cm<sup>-1</sup> e 214-193 cm<sup>-1</sup> corresponde às vibrações  $\nu(\text{M}-\text{N})$ ,  $\nu(\text{M}-\text{O})$ ,  $\nu(\text{M}-\text{N}_{\text{py}})$  e  $\nu(\text{M}-\text{Cl})$ <sup>12,13</sup>, respectivamente. Portanto, as *bis*(fenilhidrazonas) encontram-se coordenadas ao metal através do sistema quelante O-N-Npy-N-O.

<sup>7</sup> C. Carini, G. Pelizzi, P. Tarasconi, C. Pelizzi, K.C. Molloy, P.C. Waterfield, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1 (1989) 17.

<sup>8</sup> A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Inorg. Chim. Acta 362 (2009) 2117.

<sup>9</sup> A.A. Recio Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

<sup>10</sup> K.B. Gudasi, S.A. Patil, R.S. Vadavi, R.V. Shenoy, M. Nethaji, S.W.A. Bligh, Inorg. Chim. Acta 359 (2006) 3229

<sup>11</sup> V.K. Sharma, A. Srivastava, Indian J. Chem. 46A (2007) 1963.

<sup>12</sup> 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.

<sup>13</sup> K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, second ed. Wiley-Interscience, New York, 1970, p. 291.

Tabela 6.1.2 - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina-*bis*(fenilhidrazona) ( $\text{H}_2\text{AcPh}$ ), *bis*(*para*-clorofenil hidrazona) ( $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ ) e *bis*(*para*-nitrofenilhidrazona) ( $\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph}$ )

Composto	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$	$\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$	$\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$	$\rho(\text{py})$
<b><math>\text{H}_2\text{AcPh}</math></b>	<b>1664F</b>	<b>1568m</b>	<b>1519F</b>	<b>1258F</b>	<b>650f</b>
[Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] (1)	1645F	1515m	1487F	1274F	670f
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] (2)	1668F	1515m	1489F	1267F	671f
<b><math>\text{H}_2\text{AcpClPh}</math></b>	<b>1665F</b>	<b>1571m</b>	<b>1530F</b>	<b>1267F</b>	<b>660f</b>
[Bi(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] (3)	1645F	1520m	1485F	1250F	676f
[Sb(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] (4)	1681F	1514m	1482F	1270F	679f
<b><math>\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph}</math></b>	<b>1671F</b>	<b>1576m</b>	<b>1519F</b>	<b>1247F</b>	<b>634f</b>
[Bi(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] (5)	1670F	1523F	1523F	1257F	675f
[Sb(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] (6)	1686F	1523F	1523F	1270F	679f

\* F = forte, m = média e f = fraca.

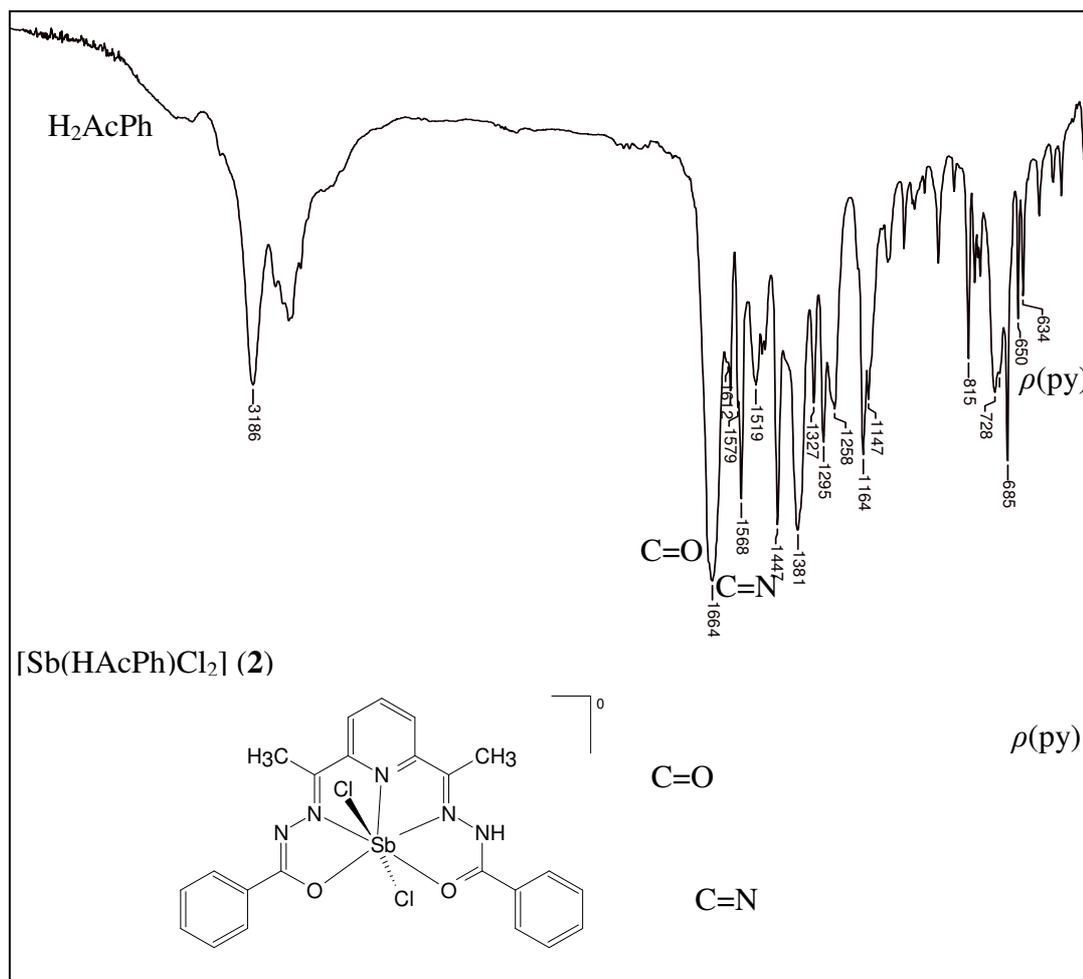


Figura 6.2 – Espectro no infravermelho do ligante H<sub>2</sub>AcPh e seu complexo [Sb(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (2) obtido em pastilha de KBr na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

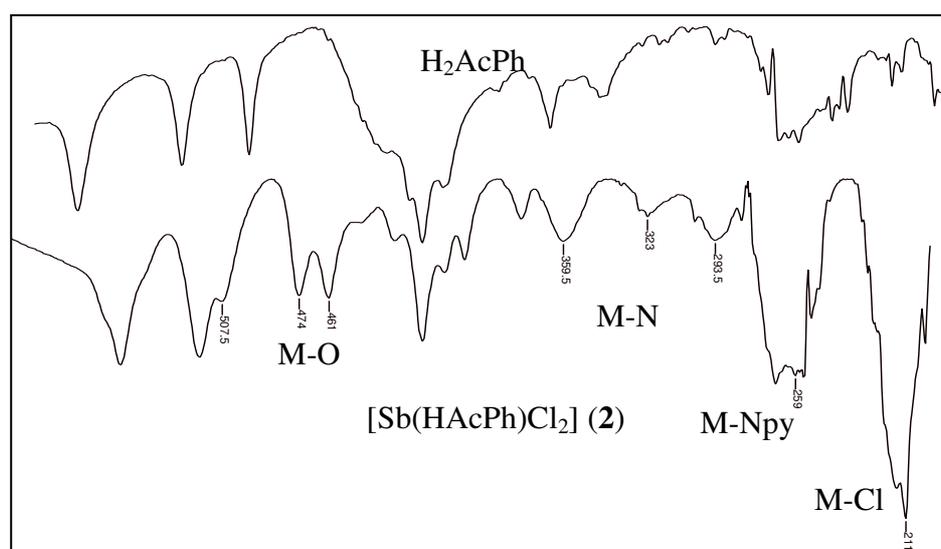


Figura 6.3 – Espectro no infravermelho de H<sub>2</sub>AcPh e seu complexo [Sb(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (2) na região de 500-200 cm<sup>-1</sup>, suporte CsI/nujol

## Espectroscopia eletrônica

Os espectros eletrônicos das *bis*(fenilhidrazonas) livres apresentam bandas em 315-302 nm ( $\epsilon = 3,14 \times 10^4 - 3,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e em 430-411 nm ( $\epsilon = 2,14 \times 10^4 - 7,88 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) atribuídas às transições  $n \rightarrow \pi^*$  do anel da piridina e  $n \rightarrow \pi^*$  dos grupos  $\text{C}=\text{N}$  e  $\text{C}=\text{O}$ <sup>14</sup> superpostas em um mesmo envelope. Com a coordenação verifica-se o deslocamento das referidas bandas para 385-360 nm ( $\epsilon = 2,4 \times 10^4 - 3,87 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e 440-460 nm ( $\epsilon = 5,88 \times 10^3 - 6,49 \times 10^3$ ). Não foi possível atribuir as bandas de transições  $\pi-\pi^*$  de mais alta energia (270nm), pois elas aparecem na região de ruído do aparelho.

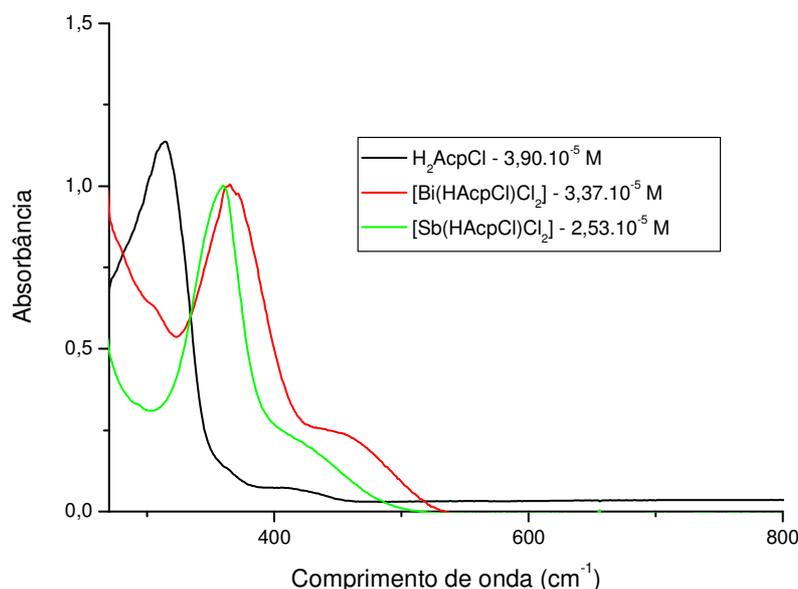


Figura 6.4 – Espectro eletrônico de  $\text{H}_2\text{AcpClPh}$  e seus complexos  $[\text{Bi}(\text{HAcpClPh})\text{Cl}_2]$  (3) e  $[\text{Sb}(\text{HAcpClPh})\text{Cl}_2]$  (4) (DMF).

## Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN das *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de antimônio(III) e bismuto(III) foram obtidos em  $\text{DMSO-}d_6$ , pois é o único solvente que solubiliza todos os ligantes e complexos. Todos os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sofrem significativos deslocamentos químicos nos complexos em relação às suas posições nas *bis*(fenilhidrazonas) livres (ver Tabelas 6.1.3 e 6.1.4).

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das *bis*(fenilhidrazonas) os sinais de  $\text{N}(3)\text{-H}$  ( $\delta$  10,76-11,30 ppm) são característicos para a molécula em sua conformação *E*, em que  $\text{N}(3)\text{-H}$  sofre uma ligação de hidrogênio com o solvente<sup>8,9,15,16</sup>. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das *bis*(fenilhidrazonas) há dois hidrogênios atribuídos a  $\text{N}(3)\text{-H}$  correspondentes aos dois braços da molécula. Nos espectros dos

<sup>14</sup> M. Carcelli, S. Ianelli, L. Mavilla, C. Pelizzi, G. Pelizzi, Inorg. Chim. Acta 245 (1996) 43.

<sup>15</sup> A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 3797.

<sup>16</sup> A.A. Recio Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247.

complexos de bismuto(III) e antimônio(III), pode-se observar a integração do sinal de N3-H para apenas um hidrogênio (esse sinal não está bem definido, pois é um hidrogênio que sofre muita troca com o solvente), sugerindo que a *bis*(fenilhidrazona) encontra-se na forma monoaniônica. Além disso, foram observados deslocamentos significativos em todos os sinais com relação às suas posições nos ligantes livres (ver Figura 6.5).

Tabela 6.1.3 - Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm), constante de acoplamento ( $J$ ) e multiplicidade ( $M$ ) dos principais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazonas) (DMSO- $d_6$ ), 200 MHz

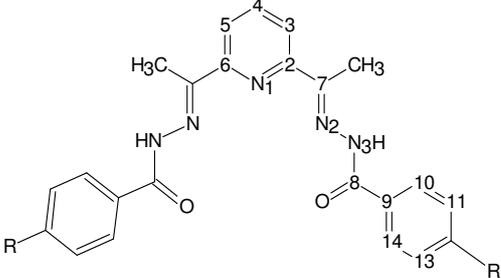
Composto	Atribuições ( $M$ ) $n^\circ$					
	H3, H5 (d*) 1	H4 (t*) 1	N(3)H (s)	H10, H14 (d*) 2	H11, H13 (t*) 2	H15 (s) 6
<b>H<sub>2</sub>AcPh</b>	<b>8,11</b>	<b>7,90;</b> <b><math>^1J=6,49</math></b>	<b>10,92</b> <b>(2)</b>	<b>7,90;</b> <b><math>^1J=6,49</math></b>	<b>7,55</b>	<b>2,54</b>
[Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>1</b> )	8,43; $^1J=7,32$	8,61; $^1J=7,86$	12,36 (1)	8,24	7,60	2,83
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> )	8,50; $^1J=7,62$	8,64; $^1J=7,80$	11,86 (1)	8,19	7,68	2,88
<b>H<sub>2</sub>Ac<sub>p</sub>ClPh</b>	<b>8,05;</b> <b><math>^1J=8,07</math></b>	<b>8,31</b>	<b>10,76</b> <b>(2)</b>	<b>7,92;</b> <b><math>^1J=7,63</math></b>	<b>7,60;</b> <b><math>^1J=8,29</math></b>	<b>2,54</b>
[Bi(HAc <sub>p</sub> ClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> )	8,41; $^1J=8,02$	8,59; $^1J=7,45$	12,44 (1)	8,20; $^1J=7,54$	7,61	2,81
[Sb(HAc <sub>p</sub> ClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>4</b> )	8,52 $^1J=7,48$	8,65; $^1J=7,94$	11,05 (1)	8,19; $^1J=7,83$	7,66	2,88
<b>H<sub>2</sub>Ac<sub>p</sub>NO<sub>2</sub>Ph</b>	<b>8,42;</b> <b><math>^1J=8,29</math></b>	<b>8,42;</b> <b><math>^1J=6,49</math></b>	<b>11,30</b>	<b>8,09;</b> <b><math>^1J=8,85</math></b>	<b>8,42</b>	<b>2,57</b>
[Bi(HAc <sub>p</sub> NO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>5</b> )	8,48; $^1J=8,81$	8,48;	11,25	8,36; $^1J=8,59$	8,36	2,81
[Sb(HAc <sub>p</sub> NO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	8,57; $^1J=7,55$	8,70; $^1J=7,27$	11,70	8,41	8,41	2,92

\*Desdobramento padrão; no entanto, devido à sobreposição de sinais são apenas observados multipletos.

Nos espectros dos complexos os sinais dos carbonos sofrem deslocamentos significativos em relação aos espectros das *bis*(fenilhidrazonas) livres. O sinal de C7, que aparece entre 155,18-154,07 ppm nos ligantes livres, desloca-se para 153,86-146,54 ppm nos complexos, indicando a coordenação através do nitrogênio imínico. Os deslocamentos dos carbonos da piridina C3, C4 e C5 indicam a coordenação pelo N<sub>py</sub>. Não foi possível observar os sinais de C8-O nos espectros dos complexos em

razão de sua baixa solubilidade, mas a coordenação através de C8-O foi evidenciada pelos espectros no infravermelho e confirmada na estrutura cristalográfica dos complexos [Sb(AcpClPh)Cl] (**4a**) e [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)(DMSO)Cl] (**5a**) (ver seção 6.2).

Tabela 6.1.4 - Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) dos principais sinais de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT 135 dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina bis(fenilhidrazonas) (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 200 MHz

							
Composto	C8	C7	C4	C3,C5	C11,C13	C10,14	C15
DEPT	-	-	↑	↑	↑	↑	↑
<b>H<sub>2</sub>AcPh</b>	<b>165,27</b>	<b>155,18</b>	<b>136,80</b>	<b>121,27</b>	<b>129,09</b>	<b>138,02</b>	<b>12,41</b>
[Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>1</b> )	-	151,12	142,74	-	128,96	128,53	15,05
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> )	-	-	143,37	127,06	128,57	128,66	15,15
<b>H<sub>2</sub>AcpClPh</b>	<b>162,82</b>	<b>154,24</b>	<b>136,17</b>	<b>120,34</b>	<b>136,90</b>	<b>128,02</b>	<b>12,48</b>
[Bi(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> )	-	151,15	142,74	126,52	130,82	128,66	15,03
[Sb(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>4</b> )	-	153,86	143,46	127,34	130,55	128,70	15,28
<b>H<sub>2</sub>AcpNO<sub>2</sub>Ph</b>	<b>163,50</b>	<b>154,07</b>	<b>137,74</b>	<b>123,33</b>	<b>138,69</b>	<b>128,12</b>	<b>12,65</b>
[Bi(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>5</b> )	-	148,81	142,22	123,53	130,18	130,18	14,63
[Sb(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	-	146,54	142,46	125,50	131,89	131,00	-



literatura encontra-se uma discussão a respeito dessa geometria de complexos de bismuto(III) e antimônio(III) podendo-se assumir duas propostas: um complexo hepta-coordenado como uma bipirâmide pentagonal, sendo o par de elétrons do metal ( $5s^2$  para Sb(III) e  $6s^2$  para Bi(III)) considerado como um “ligante”; e a outra é um complexo hexa-coordenado com uma geometria de pirâmide pentagonal<sup>17,12</sup>.

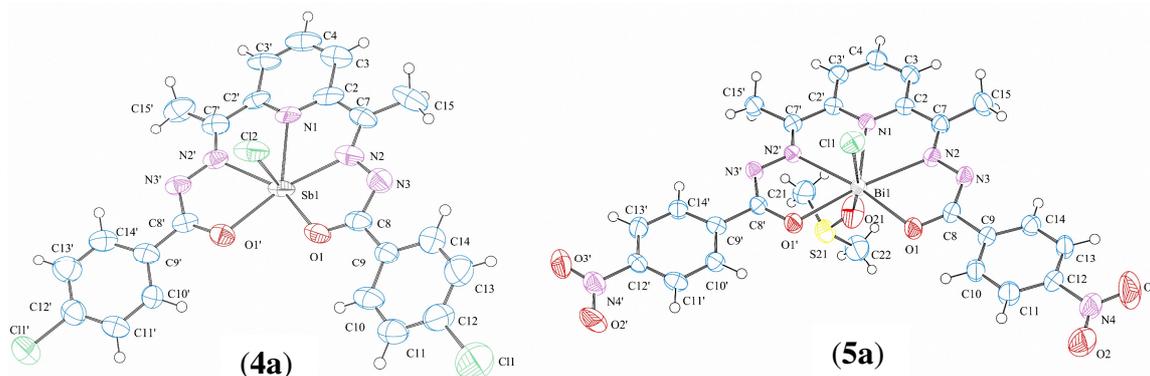


Figura 6.6 – Diagrama molecular dos complexos [Sb(AcpClPh)Cl] (**4a**) e [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)(DMSO)Cl] (**5a**).

As distâncias e ângulos de ligação nas estruturas de **4a** e **5a** encontram-se na Tabela 6.2.2 Nas estruturas de **4a** e **5a**, devido aos requerimentos geométricos das *bis*(fenilhidrazonas), o ângulo O1-M-O1' é consideravelmente maior dos que os outros quatro ângulos envolvendo o metal e o sistema quelante O-N-N-N-O (ver tabela 6.2.1). O ângulo central de um pentágono regular é 72 °, enquanto que o ângulo O1-M-O1' em **4a** e **5a** são 84,5(2) ° e 99,53(6) °, respectivamente. Já os valores dos ângulos O1-M1-N2 e O1'-M1-N2' são 67,5(2) ° e 68,4(2) ° em **4a** e 63,84(7) ° e 64,99(7) ° em **5a**, respectivamente.

Em ambos os complexos cada braço da *bis*(fenilhidrazona) adota a configuração *EZ* em relação às ligações C7-N2 e N3-C8. Em hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e *bis*(hidrazonas) as distâncias de ligações C8-O1, C7-N2 e C8-N3 encontram-se entre 1,217-1,230 Å, 1,264-1,286 Å e 1,347-1,363 Å, respectivamente<sup>18,19,20,21</sup>. Nos complexos **4a** e **5a** as distâncias da ligação C8-O1 são de 1,262(10) Å e 1,272(10) Å em **4a** e 1,281(3) Å e 1,275(3) em **5a**. Então, as ligações C8-O1 adquirem certo caráter de ligação simples em ambos **4a** e **5a**. Em **5a** as distâncias de

<sup>17</sup> 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.

<sup>18</sup> A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, J. Mol. Struct. 920 (2009) 97.

<sup>19</sup> P.V. Bernhardt, G.J. Wilson, P.C. Sharpe, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, J. Biol. Inorg. Chem. 13 (2008) 107.

<sup>20</sup> M.R. Bermejo, R. Pedrido, A.M. González-Noya, M.J. Romero, M. Vázquez, L. Sorace, New J. Chem. 27 (2003) 1753.

<sup>21</sup> J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D.N. Deobagkar, C.E. Anson, A. Powell, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 51.

ligação C7-N2 e N3-C8 são 1,290(4) Å; 1,287(3) Å e 1,316(4) Å e 1,317(3) Å, respectivamente. Portanto, C7-N2 tem um caráter predominantemente de ligação dupla enquanto que a ligação C8-N3 possui um caráter intermediário, porém mais próximo de uma dupla ligação.

Uma grande discrepância entre os valores das distâncias de ligação C7-N2 e C8-N3 foi encontrada na estrutura de **4a** (C7-N2 = 1,350(12) Å; 1,281(11) Å e C8-N3 = 1,342(11) Å; 1,325(11) Å), revelando a presença de dois braços assimétricos. Na estrutura de **5a** esse efeito não acontece. As distâncias das ligações C7-N2 e C8-N3 são próximas entre si.

Em **4a** e **5a** a *bis*(fenilhidrazona) iônica é quase planar com desvio médio dos átomos em relação ao plano formado por O1-N2-N1-N2'-O1' igual a 0,0167 Å (**4a**) e 0,0553 Å (**5a**). O íon metálico situa-se próximo a este plano [0,333(3) Å em **4a** e 0,224(1) Å em **5a**]. A maior planaridade do sistema quelante em **4a** poderia explicar as diferenças estruturais entre **4a** e **5a**.

Tabela 6.2.1 - Resumo da coleção de dados e refinamento de [Sb(AcpClPh)Cl] (**4a**) e [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl] (**5a**)

Complexo	( <b>4a</b> )	( <b>5a</b> )
Fórmula empírica	C <sub>23</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> Sb	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> Bi Cl N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> S
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	623,52	809,99
Cor	Alaranjada	Alaranjada
Dimensões do cristal (mm <sup>3</sup> )	0,36 x 0,18 x 0,40	0,36 x 0,29 x 0,13
Temperatura (K)	293(2)	293(2)
Radiação, λ (Å)	0,71073	0,71073
Intervalo de θ (°)	1,90 a 25,00	2,75 a 26,37
Intervalos de hkl	-1 ≤ h ≤ 14, -1 ≤ k ≤ 19, -15 ≤ l ≤ 14	-11 ≤ h ≤ 10, -16 ≤ k ≤ 16, -30 ≤ l ≤ 31
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> /c	P 2 <sub>1</sub> /n
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico
a (Å)	14,719(5)	8,88910(10)
b (Å)	12,939(5)	13,4044(2)
c (Å)	13,029(5)	24,9236(3)
α (°)	90	90
β (°)	104,115(5)	92,4410(10)
γ (°)	90	90
Volume (Å <sup>3</sup> )	2405,7(15)	2967,03(7)
Z	4	4
F(000)	1232	1576
Densidade calculada (Mg.m <sup>-3</sup> )	1,722	1,813
Coefficiente de absorção μ (mm <sup>-1</sup> )	1,512	6,158
Reflexões coletadas	15243	36175
Reflexões únicas/ R(int)	7024/ 0,0000	6064/ 0,0505
Parâmetros refinados/ restrições	308/ 0	381/ 0
R [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	R1 = 0,0653, wR2 = 0,1680	R1 = 0,0204, wR2 = 0,0460
R (all)	R1 = 0,1096, wR2 = 0,1991	R1 = 0,0288, wR2 = 0,0471
S	1,022	0,954
Δρ min/max (e.Å <sup>3</sup> )	-0,868/ 1,482	-0,641/ 0,718

Tabela 6.2.2 - Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Sb(AcpClPh)Cl] (**4a**) e [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl] (**5a**). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	Distâncias (Å)	
	4a	5a
M1-O1	2,235(6)	2,461(2)
M1-O1'	2,250(5)	2,436(2)
M1-N2	2,318(6)	2,494(2)
M1-N2'	2,353(6)	2,446(2)
M1-N1	2,379(6)	2,451(2)
M1-Cl1	2,399(2)	2,4951(8)
O1'-C8'	1,262(10)	1,281(3)
O1-C8	1,272(10)	1,275(3)
N3-C8	1,342(11)	1,316(4)
N3'-C8'	1,325(11)	1,317(3)
N3-N2	1,377(11)	1,372(3)
N2'-N3'	1,383(11)	1,369(3)
N2-C7	1,350(11)	1,290(4)
N2'-C7'	1,281(11)	1,287(3)
Átomos	4a	5a
O1-M1-O1'	84,5(2)	99,53(6)
O1-M1-N2	67,5(2)	63,84(7)
O1'-M1-N2	149,2(3)	159,75(7)
O1-M1-N2'	149,7(3)	162,29(7)
O1'-M1-N2'	68,4(2)	64,99(7)
N2-M1-N2'	133,5(2)	128,95(8)
O1-M1-N1	135,5(2)	128,66(7)
O1'-M1-N1	133,4(2)	130,03(7)
N2-M1-N1	69,2(3)	64,85(8)
N2'-M1-N1	66,0(2)	65,23(7)
O1-M1-Cl1	82,6(2)	84,97(6)
O1'-M1-Cl1	82,8 (2)	85,76(6)
N2-M1-Cl1	81,0(2)	81,48(6)
N2'-M1-Cl1	80,7(2)	85,30(6)
N1-M1-Cl1	81,1(1)	86,15(5)
C8'-O1'-M1	117,1(5)	115,59(17)
C8-O1-M1	117,5(5)	116,59(18)
C7'-N2'-M1	122,1(6)	121,68(18)
C7-N2-M1	120,5(6)	121,85(19)
N3'-N2'-M1	116,6(5)	119,85(16)
N3-N2-M1	120,1(5)	119,87(17)
Cl1-Bi1-O21	-	162,35(7)

### 6.3 - Atividade biológica

#### 6.3.1 - Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada contra cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*), gram-negativas

(*Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*), de acordo com os procedimentos descritos na parte experimental.<sup>22</sup>

Os valores obtidos das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos estão listados na tabela 6.3.1, juntamente com aqueles obtidos para tetraciclina, fluconazol e ciprofloxacino utilizados como referência.

Tabela 6.3.1 – Valores de CIM para as 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III)

Composto	CIM ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<b>H<sub>2</sub>AcPh</b>	NA	NA	NA	NA	NA
[Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] (1)	9,4	9,2	4,5	90,3	188,0
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] (2)	220,8	NA	43,6	406,0	431,0
<b>H<sub>2</sub>AcpCl</b>	NA	NA	NA	NA	NA
[Bi(HAcpCl)Cl <sub>2</sub> ] (3)	0,3	65,6	2,0	344,6	44,0
[Sb(HAcpCl)Cl <sub>2</sub> ] (4)	24,1	NA	9,7	409,0	NA
<b>H<sub>2</sub>AcpNO<sub>2</sub></b>	NA	NA	NA	NA	NA
[Bi(HAcpNO <sub>2</sub> )Cl <sub>2</sub> ] (5)	0,2	16,8	1,0	109,7	85,0
[Sb(HAcpNO <sub>2</sub> )Cl <sub>2</sub> ] (6)	NA	NA	NA	NA	193,0
SbCl <sub>3</sub>	124,0	NA	110,0	2115,0	NA
BiCl <sub>3</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
Tetraciclina	7,2	-	-	26,7	-
Fluconazol	-	-	-	-	59,0
Ciprofloxacino	-	0,3	0,5	-	

\*NA – não ativo; ND = não determinado (insolúvel)

As *bis*(fenilhidrazonas) foram inativas contra o crescimento de todos os microorganismos testados. Isto sugere que a substituição no anel aromático por grupos retiradores de elétrons não contribuiu para promover diferenças na atividade antimicrobiana.

A maioria dos compostos foram inativos contra *S. epidermidis*, com exceção dos complexos de bismuto(III) (CIM = 9,2-65,6  $\mu\text{M}$ ). No entanto estes foram menos ativos que a ciprofloxacina, composto usado como referência.

Após a coordenação ao bismuto(III) a atividade antimicrobiana melhorou significativamente contra o crescimento de todas as cepas de bactérias *gram*-positivas e, em menor escala, contra bactéria *gram*-negativa *P. aeruginosa*. Os complexos de bismuto(III) foram mais ativos que seus análogos de antimônio(III). [Bi(HAcpClPh)Cl<sub>2</sub>] (3) e [Bi(HAcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (5) mostraram-se mais ativos que a tetraciclina, usada como referência contra o crescimento de *S. aureus*, e tiveram uma boa atividade contra o crescimento de *E. faecalis*. Com a complexação, a atividade antifúngica também melhorou.

<sup>22</sup> 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.

Novamente, os complexos (3) e (5) foram os mais ativos, sendo 3 mais ativo que o fluconazol, composto usado como referência contra o crescimento de *C. albicans*.

De uma forma geral, após a coordenação ao antimônio(III) os complexos mostraram atividade antimicrobiana. O complexo [Sb(HAcPhNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (6) foi ativo apenas contra o fungo *C. albicans*, sendo, no entanto menos ativo que o fluconazol. Entre os complexos de antimônio(III), [Sb(HAcPhClPh)Cl<sub>2</sub>] (4) foi o mais ativo contra *S. aureus* e *E. faecalis* com valores de CIM = 24,1 e 9,7 μM, respectivamente. A substituição no anel aromático por um cloreto foi uma boa estratégia para melhorar a atividade antibacteriana. No entanto um efeito contrário pode ser observado para o complexo (6) que contém o grupo nitro.

### 6.3.2 – Atividade contra *Leishmania (L.) amazonensis* dos complexos de antimônio(III)

Nessa parte do trabalho foi feito um *screening* da atividade contra leishmania dos compostos de antimônio, conforme procedimentos descritos no capítulo 2 (secção 2.3.2). Os resultados estão apresentados na tabela 6.3.2.

Tabela 6.3.2 – Valores de inibição (%) a 100 μM para os complexos de Sb(III) de *bis*(fenilhidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina

Composto	% inibição (100 μM)
<b>H<sub>2</sub>AcPh</b>	<b>82,52</b>
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] (2)	66,56
<b>H<sub>2</sub>AcPhClPh</b>	<b>70,22</b>
[Sb(HAcPhClPh)Cl <sub>2</sub> ] (4)	77,40
<b>H<sub>2</sub>AcPhNO<sub>2</sub>Ph</b>	<b>11,09</b>
[Sb(HAcPhNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] (6)	23,62
SbCl <sub>3</sub>	70,39

Entre as *bis*(fenilhidrazonas) livres a atividade parece seguir a ordem H<sub>2</sub>AcPh>H<sub>2</sub>AcPhClPh>H<sub>2</sub>AcPhNO<sub>2</sub>Ph. Embora o sal de partida SbCl<sub>3</sub> tenha se mostrado ativo no modelo empregado, a coordenação ao antimônio(III) não resultou em melhora da atividade anti-leishmania no caso do complexo (2), mas levou a um pequeno acréscimo de atividade anti-leishmania nos casos dos complexos (4) e (6). A atividade anti-leishmania das *bis*(fenilhidrazonas) livres foi demonstrada pela primeira vez no presente trabalho.

### 6.3.4 - Atividade citotóxica

A tabela 6.3.4 mostra os valores de CI<sub>50</sub> para as *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) contra leucemias Jurkat e HL-60, células MCF-7 (tumor mamário), HCT-116 (carcinoma colo retal) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*).

As *bis*(fenilhidrazonas) foram pouco ativas contra as linhagens celulares Jurkat, MCF-7 e HCT-116. Os valores de  $CI_{50}$  foram superiores a  $100\mu\text{M}$ , exceto para  $\text{H}_2\text{AcPh}$  contra MCF-7 ( $CI_{50} = 41,15\ \mu\text{M}$ ). Assim, de modo geral pode-se sugerir que a presença dos grupos *p*-clorofenil e *p*-nitrofenil contribui para uma diminuição na citotoxicidade em comparação com o derivado não-substituído.

Após a coordenação ao antimônio(III), exceto para o complexo (6), a citotoxicidade aumentou significativamente contra as linhagens de células MCF-7 e HL60 ( $CI_{50} = 0,36\text{-}2,46\ \mu\text{M}$ ).  $[\text{Sb}(\text{HAcPh})\text{Cl}_2]$  (2) e  $[\text{Sb}(\text{HAc}p\text{ClPh})\text{Cl}_2]$  (4) foram mais ativos que a cisplatina usada como referência. A coordenação ao bismuto(III) foi uma boa estratégia para aumentar a atividade citotóxica das *bis*(fenilhidrazonas).  $[\text{Bi}(\text{HAcPh})\text{Cl}_2]$  (1),  $[\text{Bi}(\text{HAc}p\text{ClPh})\text{Cl}_2]$  (3) e  $[\text{Bi}(\text{HAc}p\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$  (5) foram mais ativos que seus análogos de antimônio(III). Em geral, 1, 3 e 5 foram mais ativos que a cisplatina. Entre os complexos de bismuto(III), 1 foi mais ativo contra todas as células tumorais testadas.

Apesar de não ser possível avaliar a atividade citotóxica do cloreto de bismuto(III) devido à sua baixa solubilidade, através dos resultados obtidos para o cloreto de antimônio(III), pode-se sugerir que a atividade dos complexos de bismuto(III) está associada ao complexo e não apenas à presença do metal.

Em geral, os valores de  $CI_{50}$  em células de sangue periférico (PBMC) foram maiores do que os valores de  $CI_{50}$  em células tumorais, ou seja, os compostos são ativos em uma concentração inferior àquela que provoca um efeito tóxico. Apenas o complexo (1) foi tóxico contra células Jurkat e HCT-116 e o sal de antimônio(III) contra todas as linhagens celulares.

Como mostrado na tabela 6.5.1, apesar de o complexo (1) apresentar maior citotoxicidade contra as células tumorais investigadas, 3 foi o melhor candidato como antitumoral devido ao seu maior valor de índice terapêutico [ $IT = CI_{50}(\text{PBMC}) / CI_{50}(\text{células tumorais})$ ]. Os valores de IT do complexo (3) foram 11 (Jurkat), 508 (HL60), 109 (MCF-7) e 11 (HCT-116). O complexo (5) apresentou IT = 11 (Jurkat), 11 (HL60), 43 (MCF-7) e 6 (HCT-116). Os complexos de antimônio(III) também mostraram bons valores de índices terapêuticos (IT = 5-231) contra células HL-60 e IT = 43 para o complexo (4) contra células MCF-7. Os valores de  $CI_{50}$  para a cisplatina contra células PBMC foi  $3,37\ \mu\text{M}$  e seus valores de  $IT \ll 1$  contra todas as linhagens de células tumorais, indicando sua alta toxicidade em células normais.

Tabela 6.3.3 – Atividade citotóxica (CI<sub>50</sub>) das 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) contra linhagens de células Jurkat, HL-60, MCF-7, HCT-116 e PBMC

Composto	CI <sub>50</sub> (µM)				
	Entre parênteses intervalo de confiança 95 %				
	Jurkat	HL60	MCF-7	HCT-116	PBMC
<b>H2AcPh</b>	<b>&gt;100</b>	<b>0,98</b> <b>(0,44 - 2,18)</b>	<b>41,15</b> <b>(10,93 - 155,00)</b>	<b>&gt;100</b>	<b>85,92</b> <b>(20,29 - 363,80)</b>
(1)	1,29 (0,57 - 2,92)	0,09 (0,04 - 0,18)	0,27 (0,18 - 0,41)	2,83 (2,13 - 3,77)	1,29 (0,22 - 7,43)
(2)	>100	0,39 (0,19 - 0,85)	2,46 (1,34 - 4,52)	>100	36,48 (6,96 - 191,30)
<b>H<sub>2</sub>AcpClPh</b>	<b>&gt;100</b>	<b>1,78</b> <b>(0,83 - 3,82)</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
(3)	10,56 (3,77 - 29,57)	0,23 (0,11 - 0,47)	1,07 (0,67 - 1,73)	10,22 (7,67 - 13,61)	117,0 (10,7 - 1278,0)
(4)	>100	0,36 (0,16 - 0,79)	1,93 (0,86 - 4,33)	>100	83,32 (13,03 - 532,8)
<b>H<sub>2</sub>AcpNO<sub>2</sub>Ph</b>	<b>&gt;100</b>	<b>2,60</b> <b>(1,42 - 4,78)</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
(5)	2,06 (0,92 - 4,62)	0,20 (0,11 - 0,38)	0,5403 (0,36 - 0,81)	3,80 (2,8 - 5,13)	22,94 (9,99 - 52,66)
(6)	>100	21,72 (8,553 - 55,16)	>100	>100	>100
SbCl <sub>3</sub>	>100	67,89 (48,09 - 95,86)	>100	>100	55,68 (3,05 - 1015,0)
Cisplatina	14,42 (11,44 - 18,18)	5,73 (2,29 - 14,33)	66,83 (24,49 - 182,30)	22,27 (6,77 - 73,21)	3,37 (2,67 - 4,08)

### 6.3.5 – Investigação do potencial pró-apoptótico das *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III)

A coordenação de *bis*(fenilhidrazonas) ao bismuto(III) foi mais eficaz para a obtenção de novos candidatos a fármacos antitumorais do que a coordenação ao antimônio(III). A partir desses resultados resolveu-se investigar potencial pro-apoptótico dos complexos de bismuto(III) através do estudo de fragmentação de ADN. O conteúdo de ADN subdiplóide foi usado para quantificar a fragmentação do ADN celular, uma das marcas da morte por apoptose. Assim, as células com um aumento de conteúdo de ADN subdiplóide (maior quantidade de ADN fragmentado) são classificadas como apoptóticas. A figura 6.7 apresenta os gráficos de porcentagem do conteúdo ADN subdiplóide induzido pelas *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) em células de HL60, Jurkat, MCF-7 e HCT-116.

Todas as *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) induziram significativa fragmentação do ADN em células HL60. Isso indica que a morte por apoptose é um dos modos de ação citotóxica contra essa linhagem celular. O complexo [Bi(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (1) promoveu

significativamente a fragmentação do ADN em células Jurkat enquanto que as *bis*(fenilhidrazonas) e os complexos  $[\text{Bi}(\text{HAc}p\text{ClPh})\text{Cl}_2]$  (**3**) e  $[\text{Bi}(\text{HAc}p\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$  (**5**) exibiram um efeito moderado.  $[\text{Bi}(\text{HAcPh})\text{Cl}_2]$  (**1**) e  $[\text{Bi}(\text{HAc}p\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$  (**5**) induziram consideravelmente a fragmentação do ADN em células HCT-116 enquanto que os outros compostos não foram muito eficazes. Todos os complexos foram mais ativos que seus respectivos ligantes livres, sugerindo que a coordenação ao bismuto(III) poderia ser uma estratégia interessante para promover apoptose em células HCT-116. As *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos induziram fragmentação do ADN de forma moderada em células MCF-7, sugerindo que a indução de apoptose não seria o único modo de ação citotóxica contra essa linhagem celular.

Embora as *bis*(fenilhidrazonas) provaram ser praticamente inativas como agentes antimicrobianos e citotóxicos, seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) demonstraram tais atividades. A coordenação ao bismuto(III) revelou-se uma melhor estratégia para melhorar as atividades antimicrobiana e citotóxica. Os complexos de bismuto(III) apresentaram atividade citotóxica em concentrações nano molares contra células HL60 e MCF-7.

Uma vez que as *bis*(fenilhidrazonas) revelaram-se fracamente bioativas, seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) podem agir aumentando a biodisponibilidade dos metais devido ao caráter lipofílico dos ligantes ( $\log P = 3,86-4,96$ )<sup>23</sup>, bem como pela liberação lenta do metal para o alvo biológico.

A administração sinérgica de cisplatina e compostos de bismuto é conhecida por reduzir os efeitos colaterais tóxicos da cisplatina, um efeito que pode ser atribuído ao aumento da produção de metalotioneína induzido por bismuto<sup>6</sup>. Portanto, o estudo no desenvolvimento de novos fármacos baseados em bismuto pode ser uma estratégia interessante na terapia antitumoral.

Os resultados aqui apresentados foram objeto do artigo intitulado *Investigation on the pharmacological profile of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes*, recentemente publicado em European Journal of Medicinal Chemistry (K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. da Silva, L.F. de Miranda, C.F.D. Romeiro, E.M. Souza-Fagundes, I.C. Mendes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 53 (2012) 98 - ver Anexo).

---

<sup>23</sup> VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org> (2005).

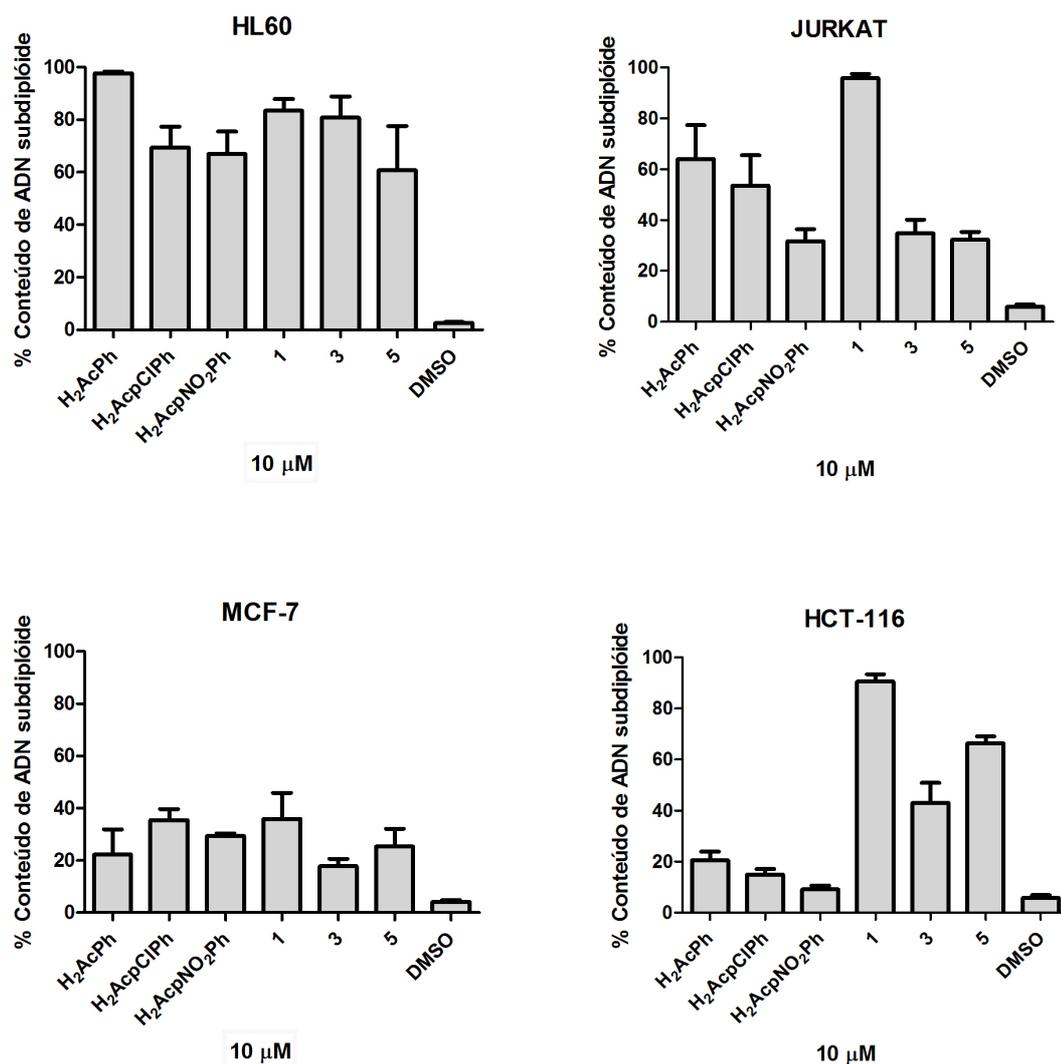


Figura 6.7 - Conteúdo ADN subdiploide induzido pelas bis(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) em células de HL60, Jurkat, MCF-7 e HCT-116.

## ***Investigação sobre as bioatividades de complexos de platina(II,IV) e de estanho(IV) de clioquinol***

5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol, HQI) (Figura 7.1) é um derivado halogenado de 8-hidroxiquinolína que foi usado nas décadas de 1950-1970 como agente oral anti-parasitário para o tratamento e prevenção de amebíase intestinal, mas o seu mecanismo de ação como um antimicrobiano era desconhecido.<sup>1</sup>

Recentemente, tem se mostrado o potencial do clioquinol para o tratamento das doenças de Alzheimer e Huntington. A atividade na doença de Alzheimer está relacionada com a capacidade com que o clioquinol se liga ao cobre. Um estudo de fase II do clioquinol oral em pacientes com doença de Alzheimer mostrou que o composto melhorou a cognição desses pacientes.<sup>1</sup> Já que HQI atua como um quelante de metais e interfere na atividade de enzimas, como a superóxido dismutase-1 (SOD1), ele se tornou um protótipo para o desenvolvimento de compostos antitumorais. Pesquisas mostram que o tratamento com clioquinol reduziu a viabilidade celular de oito diferentes linhagens de células tumorais humanas, com baixos valores de IC<sub>50</sub>.<sup>2</sup>

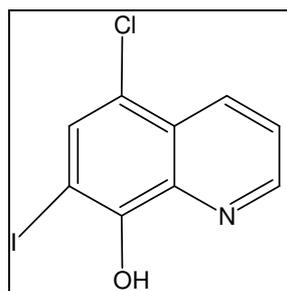


Figura 7.1 – Estrutura de 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolína (clioquinol, HQI).

Diante das atividades antitumoral e antimicrobiana do clioquinol e das bioatividades de complexos metálicos de platina e de estanho, neste trabalho foram preparados complexos de clioquinol desses metais com o objetivo de avaliar sua atividade citotóxica e antifúngica, bem como a ocorrência de um possível sinergismo entre as ações do metal e do ligante nesses compostos.

### ***7.1.1- Análises dos complexos de platina(II,IV)***

Os complexos foram sintetizados conforme procedimento citado no capítulo 2. A caracterização foi feita a partir de análise elementar, ponto de fusão, medidas de condutividade molar, análise da curva termogravimétrica (TG) e dos espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN). A Tabela 7.1.1 apresenta as cores, massas molares (MM), condutividades molares, análise elementar, e temperaturas de fusão dos complexos obtidos.

<sup>1</sup> X. Mao, A.D. Schimmer, Toxicol. Let. 182 (2008) 1.

<sup>2</sup> W.Q. Ding, B. Liu, J.L. Vaught, H. Yamauchi, S.E. Lind, Cancer Res. 65 (2005) 3389.

Tabela 7.1.1 – Dados analíticos obtidos para os complexos de platina(II,IV) com clioquinol

Composto	Cor	MM (g mol <sup>-1</sup> )	$\Lambda_M^a$	Análise Elementar (%) <sup>b</sup>			Temp. de fusão <sup>c</sup> °C	
				C	H	N		
<b>1</b>	[Pt(QI) <sub>2</sub> ].2KCl	Marrom	953,16	27,0	22,95 (22,68)	0,99 (0,85)	2,58 (2,94)	dec. a 222
<b>2</b>	[Pt(QI) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].KCl	Vermelha	949,52	16,6	22,71 (22,77)	0,91 (0,85)	2,79 (2,95)	> 300

<sup>a</sup> $\Lambda_M$ : ( $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ) DMF~ $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>Valores teóricos entre parênteses; <sup>c</sup>Ponto de fusão do clioquinol: 175-183 °C.

Com base nos dados apresentados na tabela 7.1.1 o complexo de platina(II) é neutro e contém duas moléculas aniônicas de clioquinol. O KCl poderia surgir da reação feita a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>. O complexo (2) também é neutro, formado por duas moléculas aniônicas de clioquinol e dois ligantes cloretos coordenados ao centro metálico de platina(IV). Novamente o KCl poderia ter origem na reação feita a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>.

#### *Espectroscopia no Infravermelho dos complexos de platina(II,IV)*

As atribuições das bandas no espectro infravermelho do clioquinol e de seus complexos de platina(II,IV) estão apresentadas na tabela 7.1.2. As figuras 7.3 e 7.4 mostram os espectros do clioquinol e seu complexo [Pt(QI)<sub>2</sub>].2KCl (1) na região de alta frequência e do clioquinol e seu complexo [Pt(QI)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].KCl (2) em baixa frequência, respectivamente.

Comparações entre os espectros do clioquinol e dos seus complexos de platina(II,IV) mostram que com a coordenação o número de bandas diminui e outras bandas perdem a intensidade. Esse efeito é esperado em virtude da maior simetria dos complexos. No espectro do clioquinol observa-se uma banda forte em 3070 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento  $\nu(\text{O-H})$ . Nos espectros dos complexos (1) e (2) essa banda desaparece, indicando a coordenação do clioquinol em sua forma aniônica. O espectro do clioquinol mostra cinco bandas intensas na região entre 1395-1201 cm<sup>-1</sup> características da interação entre as absorções de deformação angular no plano  $\rho(\text{O-H})$  e do estiramento  $\nu(\text{C-O})$ , enquanto que nos espectros dos complexos aparece apenas uma banda em 1364 cm<sup>-1</sup>. Em 1577 cm<sup>-1</sup> aparece uma banda atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C=N})$  que com a coordenação sofre um deslocamento para 1552 cm<sup>-1</sup> nos espectros de ambos os complexos. Com a coordenação, a banda característica do modo de deformação no plano do anel da piridina sofre um deslocamento significativo, passando de 616 cm<sup>-1</sup> no espectro do clioquinol para 676 e 667 cm<sup>-1</sup> nos espectros dos complexos [Pt(QI)<sub>2</sub>].2KCl (1) e [Pt(QI)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].KCl (2), respectivamente. Essas variações de deslocamentos estão de acordo com a coordenação do clioquinol através dos átomos de oxigênio e do nitrogênio heteroaromático<sup>3</sup>. Nos espectros dos complexos (1) e complexos (2) obtidos na região entre 700-200 cm<sup>-1</sup> novas bandas em

<sup>3</sup> C.C Wagner, S. Calvo, M.H. Torre, E.J. Baran, J. Ramam Spectrosc. 38 (2007) 373.

389  $\text{cm}^{-1}$  e em 345  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos  $\nu(\text{Pt}-\text{O})^4$  e  $\nu(\text{Pt}-\text{N})^5$ , respectivamente. As figuras 7.2 e 7.3 mostram os espectros no infravermelho do complexo (2) nas regiões entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  e 650-200  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 7.1.2 - Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos de platina(II, IV)

Composto	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CO})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MO})$	$\nu(\text{MN})$
HQI	3070F	1577m	1201F	616f	-	-
$[\text{Pt}(\text{QI})_2] \cdot 2\text{KCl}$ (1)	-	1552m	1140m	676f	389	345
$[\text{Pt}(\text{QI})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{KCl}$ (2)	-	1552m	1201m	667f	389	345

\*F= forte; m= média; f= fraca.

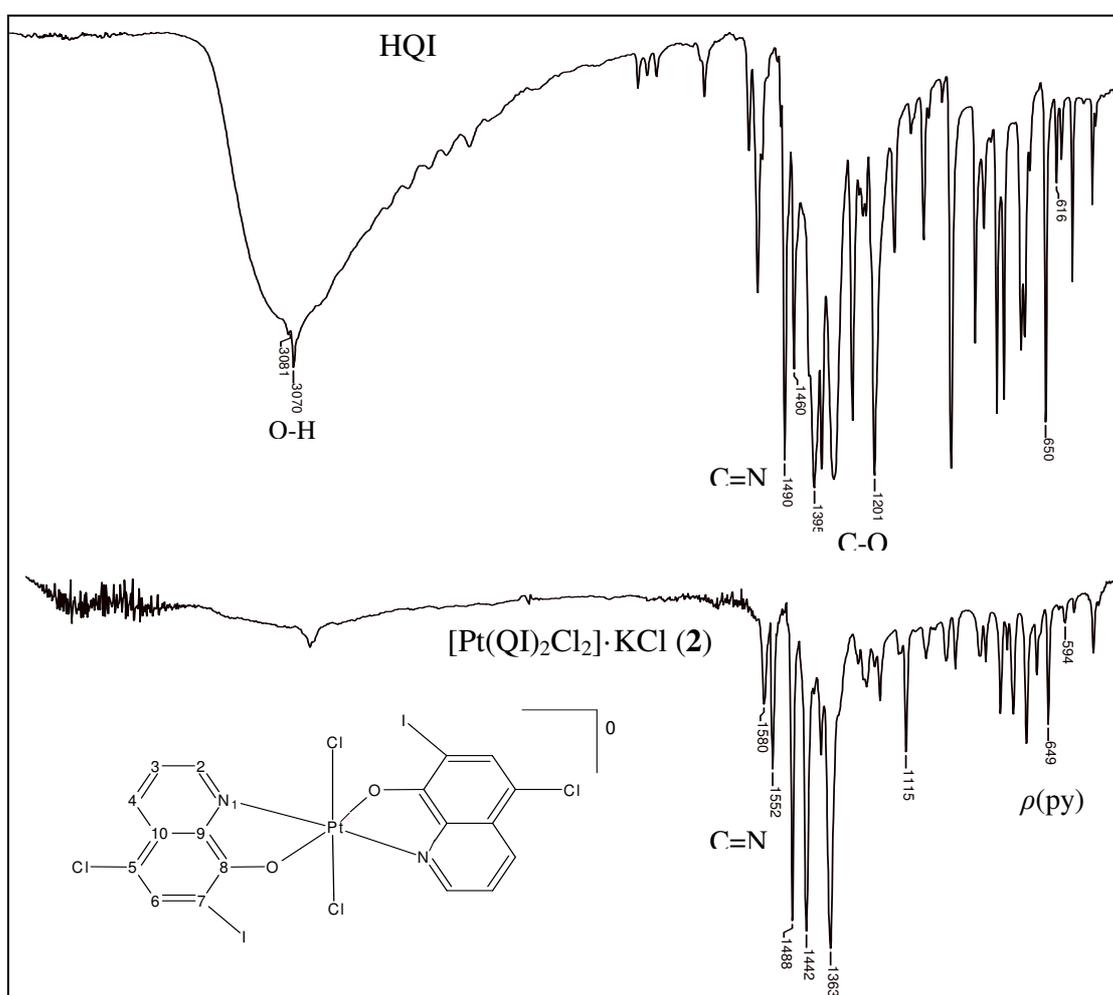


Figura 7.2 – Espectro no infravermelho do clioquinol e seu complexo  $[\text{Pt}(\text{QI})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{KCl}$  (2) obtido em pastilha de KBr, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>4</sup> G.A. Al-Hazmi, N.M. El-Metwally, O.A. El-Gammal, A.A. El-Asmy, Spectrochim. Acta Part A 69 (2008) 56.

<sup>5</sup> D. Kovala-Demertzi, A. Papageorgiou, L. Papathanasis, A. Alexandratos, P. Dalezis, J.R. Miller, M.A. Demertzi, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1296.

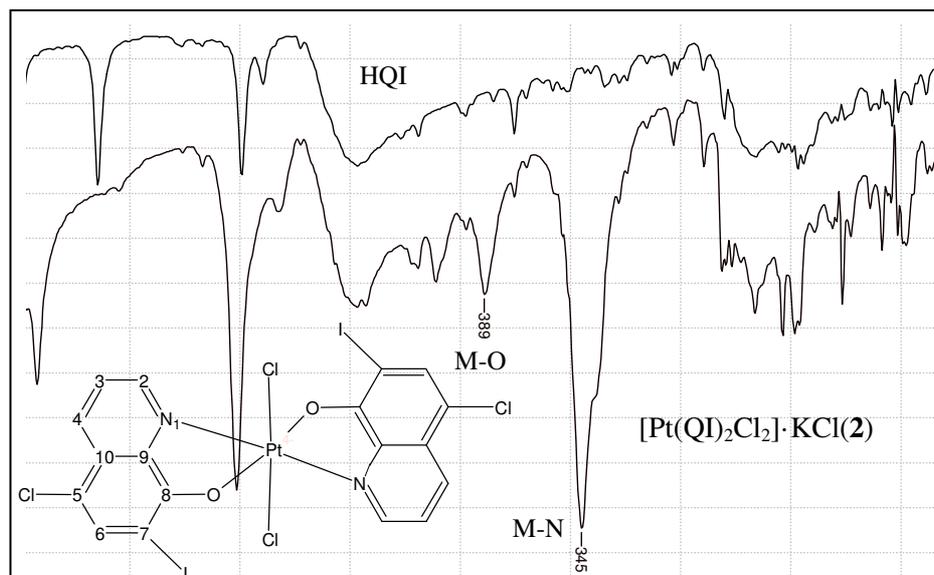


Figura 7.3 - Espectro no infravermelho do clioquinol e seu complexo  $[\text{Pt}(\text{QI})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{KCl}(2)$  obtido em nujol/CsI,  $650\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ .

#### *Ressonância Magnética Nuclear dos complexos organoestânicos*

As atribuições dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) dos complexos de platina(II,IV) encontram-se na tabela 7.1.3. Os complexos (1) e (2) são pouco solúveis em  $\text{DMSO-}d_6$  e  $\text{CDCl}_3$ , impossibilitando a atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  dos anéis aromáticos do complexo  $[\text{Pt}(\text{QI})_2] \cdot 2\text{KCl}$  (1) sofrem deslocamentos significativos em relação aos sinais do clioquinol livre, sugerindo a coordenação através dos átomos de oxigênio e nitrogênio. O desaparecimento do sinal do hidrogênio da hidroxila no espectro do complexo (1) indica a coordenação do clioquinol em sua forma aniônica. Na figura 7.4 estão os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol e do seu complexo de platina(II) (1).

O complexo (2) reage com  $\text{DMSO-}d_6$  rapidamente. Na figura 7.5 estão os espectros do clioquinol e do complexo (2) obtidos logo após a adição do solvente e após 2 dias. Também foi feito um experimento de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo (2), em  $\text{CDCl}_3$  porém o composto parece decompor-se nesse solvente, pois sinais característicos do ligante aparecem em maior proporção. Portanto, apenas os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo (1) foram atribuídos.

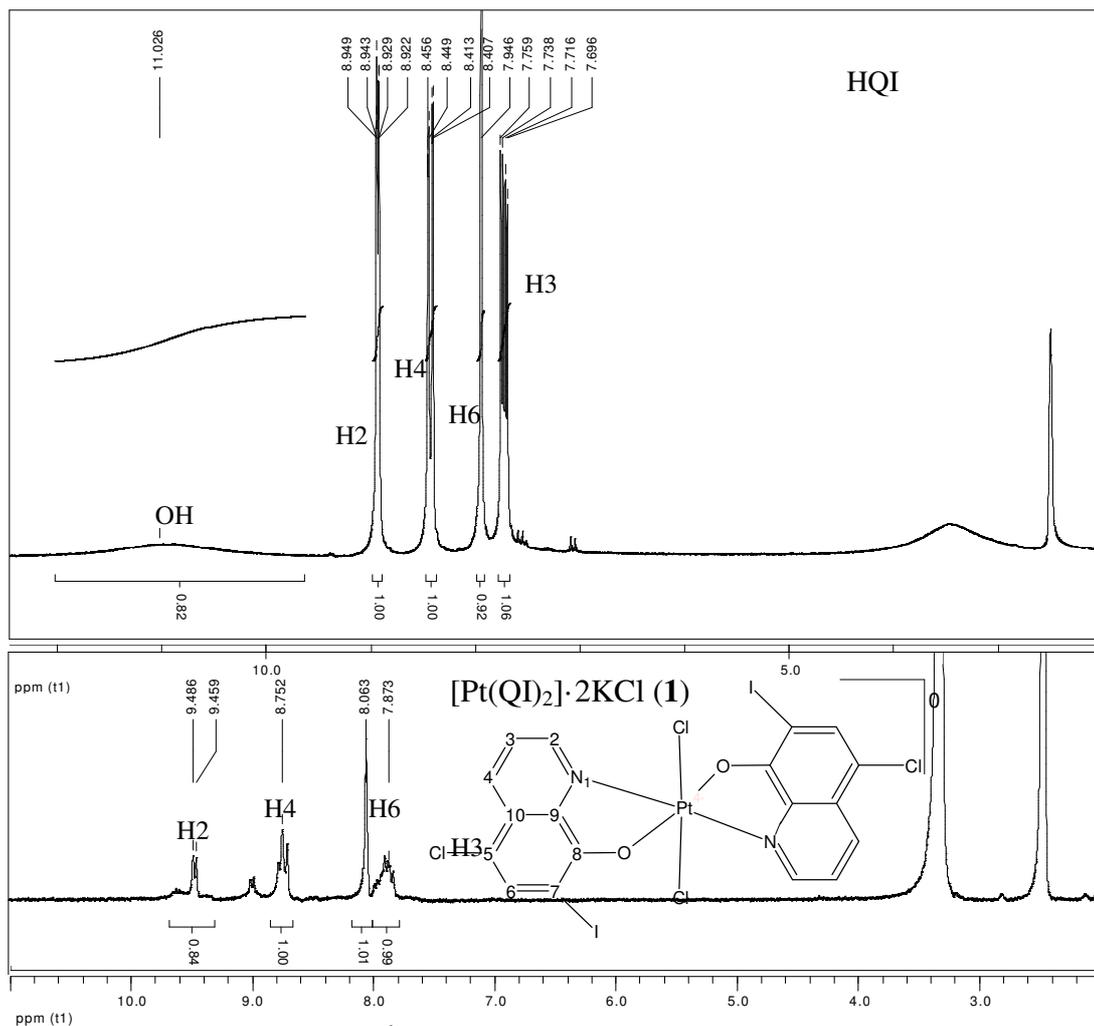
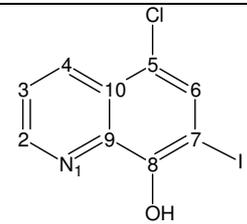


Figura 7.4 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol e seu complexo de platina(II)  $[\text{Pt}(\text{QI})_2] \cdot 2\text{KCl}$  (1) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

Tabela 7.1.3 - Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm), multiplicidade (M) e constante de acoplamento ( $J$ ) dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol e seus complexos de platina(II) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz

 <b>Composto</b>	Atribuições (M) $n^\circ$ ( $\text{DMSO-}d_6$ )				
	<b>H2 (d)</b> <b>1</b>	<b>H3 (dd)</b> <b>1</b>	<b>H4 (dd)</b> <b>1</b>	<b>H6 (s)</b> <b>1</b>	<b>O-H</b>
<b>HQI</b>	8,95-8,92 $^1J = 4,08$ ; $^2J = 1,30$	7,76-7,70 $^1J = 4,19$	8,46-8,41 $^1J = 8,54$ ; $^2J = 1,32$	7,95	11,03
$[\text{Pt}(\text{QI})_2] \cdot 2\text{KCl}$ (1)	9,02-9,00	7,98-7,90	8,80-8,75	8,06	-

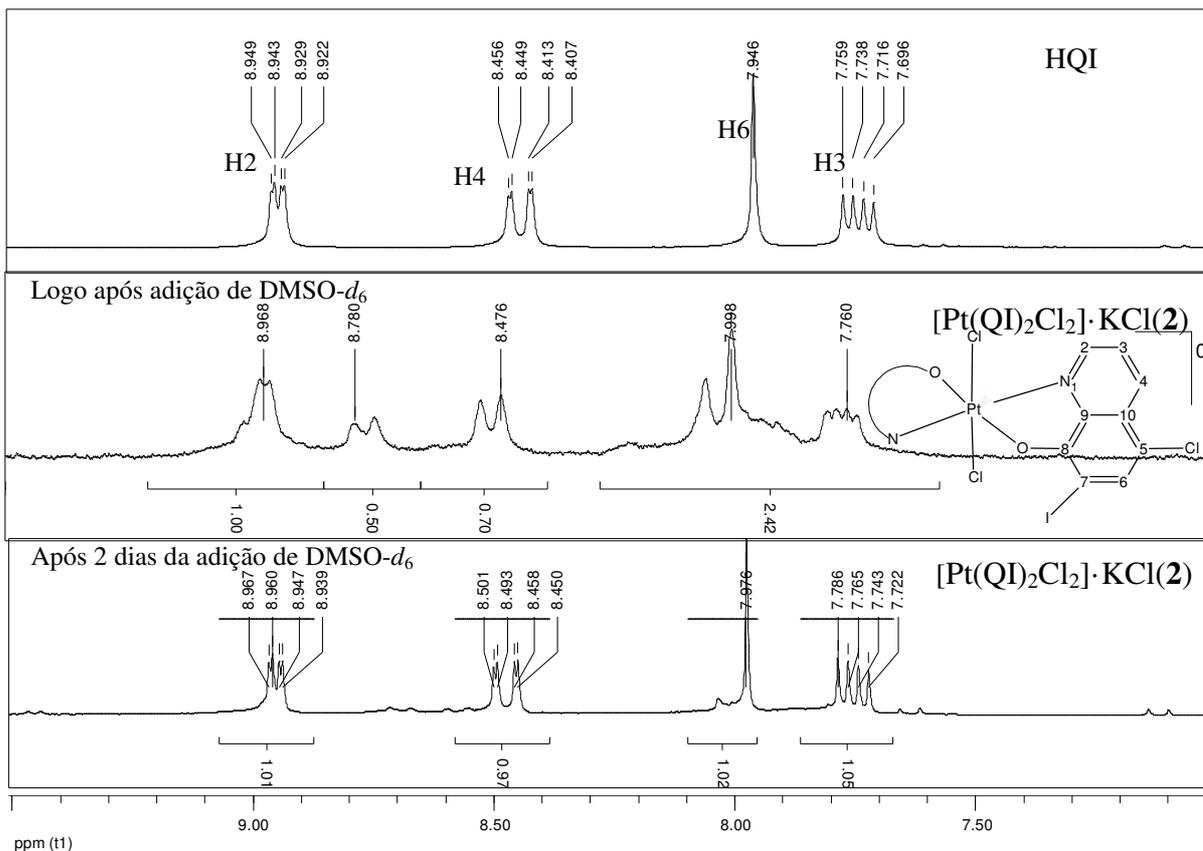


Figura 7.5 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  entre 9,5-7,0 ppm do clioquinol e seu complexo de platina(IV)  $[\text{Pt}(\text{QI})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{KCl}(2)$  logo após adição do solvente e após dois dias, em  $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz.

### 7.1.2 – Cristalografia por Difração de Raios X

Pela difusão lenta do complexo (1) em uma solução de DMSO/acetona foram obtidos monocristais de  $[\text{Pt}(\text{QI})(\text{DMSO})\text{Cl}]$  (1a). Os dados cristalográficos e de refinamento estão apresentados na tabela 7.1.2.1. Na figura 7.6 mostra o diagrama molecular da estrutura do complexo (1a).

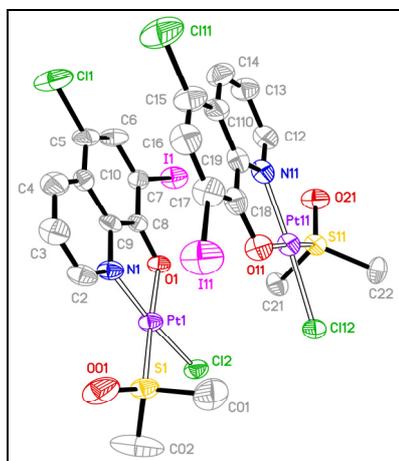


Figura 7.6 – Diagrama molecular do complexo  $[\text{Pt}(\text{QI})\text{Cl}(\text{DMSO})]$  (1a).

O complexo (**1a**) é uma molécula neutra, contendo um ligante cloreto, uma molécula de DMSO e uma molécula do clioquinol em sua forma aniônica coordenados ao centro de platina(II). A coordenação ao metal ocorre através dos átomos de nitrogênio e oxigênio. Comparações entre os complexos (**1**) e (**1a**) indicam que a formação de (**1a**) em solução DMSO/acetona ocorreu a partir da saída de uma molécula de clioquinol aniônica da esfera de coordenação do metal e a entrada de uma molécula de DMSO e de um ligante cloreto, sendo este último advindo das moléculas de KCl presentes no composto. Na tabela 7.1.2.3 encontram-se as distâncias e ângulos dos átomos selecionados do clioquinol<sup>6</sup> e do complexo (**1a**).

Como esperado, as distâncias e ângulos de ligação nos quais os átomos coordenantes estão envolvidos sofrem variações significativas após a coordenação ao íon metálico. No clioquinol, as distâncias entre C7-C8, C8-C9 e C8-O1 são de 1,358(1) Å, 1,3986(9) Å e 1,372(2) Å, respectivamente, passando para 1,380(14) Å, 1,421(14) Å e 1,317(11) Å no complexo (**1a**), respectivamente. A platina forma um anel de cinco membros em que as distâncias entre N1-Pt1 e O1-Pt1 são praticamente iguais. Isso provoca variações mais significativas na distância de ligação entre C8-O1 de aproximadamente 0,05 Å. Os ângulos entre N1-C9-C8 e C7-C8-C9 são afetados da mesma forma, passando de 118,37 ° e 120,15 ° no clioquinol para 115,7(9) ° e 116,0(9) ° no complexo (**1a**), uma diminuição de aproximadamente 5 ° para alcançar maior estabilidade para essa geometria.

---

<sup>6</sup> J.M. Leger, P.Marsau, J.Housty, C.R. Acad. Sci.C Chim. 274 (1972) 1991.

Tabela 7.1.2.1 – Resumo da coleção de dados e refinamento do complexo [Pt(QI)Cl(DMSO)] (**1a**)

Composto	( <b>1a</b> )
Fórmula empírica	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> INO <sub>2</sub> Pt S
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	613,15
Cor	Marrom
Dimensões do cristal (mm <sup>3</sup> )	0,4008 x 0,2279 x 0,1024
Temperatura (K)	170(2)
Radiação, λ (Å)	MoK <sub>α</sub> , 0,71073
Intervalo de θ (°)	2,82 to 26,37
Intervalos de hkl	-9 ≤ h ≤ 9, -25 ≤ k ≤ 25, -25 ≤ l ≤ 25
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> /c
a (Å)	7,23850(10)
b (Å)	20,4599(4)
c (Å)	20,2428(3)
α (°)	90(3)
β (°)	93,078(2)
γ (°)	90(3)
Volume (Å <sup>3</sup> )/ Z	2993,61(8)/ 8
F(000)	2240
Densidade calculada (mg.m <sup>-3</sup> )	2,721
Coefficiente de absorção μ (mm <sup>-1</sup> )	11,928
Reflexões coletadas	45129
Reflexões únicas/ R(int)	6092/ 0,0555
Parâmetros refinados/ restrições	347/ 0
R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0467; wR2 = 0,0913
R (all)	R1 = 0,0577; wR2 = 0,0946
Qualidade de ajuste, S	1,187
Δρ min/max (e.Å <sup>3</sup> )	-1,317 / 1,775

Tabela 7.1.2.3 - Distâncias (Å) e ângulos (°) entre os átomos selecionados de [Pt(QI)Cl(DMSO)] (**1a**).

Desvio padrão entre parênteses

Átomos	Distâncias (Å)		Átomos	Ângulos (°)	
	HQI	(1a)		HQI	(1a)
C2-N1	1,3092(9)	1,314(14)	N1-C9-C8	118,37	115,7(9)
C9-N1	1,360(0)	1,388(13)	C2-N1-C9	119,16	118,9(9)
C8-C9	1,3986(9)	1,421(14)	C8-C7-I1	121,55	119,2(8)
C7-C8	1,358(1)	1,380(14)	C7-C8-C9	120,15	116,0(9)
C5-Cl1	1,754(3)	1,757(11)	C2-N1-Pt1	-	130,0(8)
C7-I1	2,103(2)	2,092(10)	C8-O1-Pt1	-	112,1(6)
C8-O1	1,372(2)	1,317(11)	O1-S1-Pt1	-	177,7(2)
N1-Pt1	-	2,026(9)	N1-Pt1-O1	-	82,2(3)
O1-Pt1	-	2,024(7)	N1-Pt1-S1	-	98,0(3)
S1-Pt1	-	2,185(3)	O1-Pt1-S1	-	177,7(2)
Cl2-Pt1	-	2,342(3)	N1-Pt1-Cl2	-	172,3(3)
			O1-Pt1-Cl2	-	90,2(2)
			S1-Pt1-Cl2	-	89,66(10)

### 7.1.3 – Atividade citotóxica

A atividade citotóxica do clioquinol, seus complexos de platina(II,IV) e os respectivos sais de partida foi avaliada frente às linhagens leucêmicas Jurkat e HL60 e às células de tumores MCF-7 (carcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colo-retal). A cisplatina foi utilizada como um composto de referência.

Todos os compostos demonstraram baixa atividade contra a proliferação celular das linhagens Jurkat, MCF-7 e HCT-116 a 10 µM. No entanto, o resultado da atividade contra HL-60 foi interessante. A coordenação a platina(II) e platina(IV) resultou em um aumento de 2,5 vezes na atividade citotóxica. A tabela 7.1.3.1 apresenta os valores de concentração em µM que inibe 50 % do crescimento (CI<sub>50</sub>) das células leucêmicas HL-60.

Tabela 7.1.3.1 - Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) do clioquinol e seus complexos de platina(II,IV) contra leucemia HL-60

Composto	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )
	Intervalo de confiança a 95% entre parêntesis
	<b>HL60</b>
<b>HQI</b>	11,1 (8,8 a 14,1)
<b>(1)</b>	3,3 (2,1 a 5,0)
<b>(2)</b>	3,4 (2,3 a 5,0)
$K_2PtCl_4$	>100
$K_2PtCl_6$	>100
Cisplatina	5,7 (2,3 a 14,3)

Apesar das diferenças entre os complexos  $[Pt(QD)_2] \cdot 2KCl$  (**1**) e  $[Pt(QD)_2Cl_2]$  (**2**), os valores de  $CI_{50}$  foram semelhantes. Estudos mostram que a atividade do íon de platina(IV) está relacionada com a sua redução à platina(II) no organismo<sup>7</sup>. Isso pode ter acontecido com o complexo (**2**) que demonstrou atividade semelhante à do complexo (**1**).

Ambos os complexos foram ligeiramente mais ativos que a cisplatina e que o clioquinol livre. Essa atividade pode ser atribuída ao complexo como uma entidade, já que os sais de partida não foram ativos e que o clioquinol livre foi menos ativo. A inserção do metal pode provocar alterações na lipofilia, facilitando a entrada do complexo para o meio celular.

<sup>7</sup> M.D. Hall, T.W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 49.

## 7.2.1- Análises dos complexos de organoestânicos

Os complexos organoestânicos foram caracterizados a partir de análise elementar, temperaturas de fusão, medidas de condutividade molar, análise da curva termogravimétrica (TG) e de seus espectros eletrônicos, de massas, no infravermelho, de ressonância magnética nuclear (RMN) e Mössbauer. A Tabela 7.2.1 apresenta as cores, massas molares (MM), condutividades molares ( $\Lambda_M$ ), análise elementar, e temperaturas de fusão dos complexos.

Tabela 7.2.1 – Dados analíticos obtidos para os complexos organoestânicos com clioquinol

Composto	Cor	MM (g mol <sup>-1</sup> )	$\Lambda_M^a$	Análise Elementar (%) <sup>b</sup>			Temp. de fusão <sup>c</sup> °C
				C	H	N	
<b>3</b> [( <i>n</i> -Bu)Sn(QI) <sub>2</sub> ]Cl·2H <sub>2</sub> O	Amarela	856,29	91,7	31,22 (30,86)	2,60 (2,47)	2,90 (3,27)	159- 161
<b>4</b> [SnPh(QI)Cl <sub>2</sub> ]·EtOH	Amarela	617,28	11,4	33,40 (33,08)	2,24 (2,45)	2,22 (2,27)	96-98

<sup>a</sup> $\Lambda_M$ : ( $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ) DMF~ $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>Valores teóricos entre parênteses; <sup>c</sup>Ponto de fusão do clioquinol: 175-183 °C.

Os resultados das análises sugerem que o complexo (**3**) é eletrólito do tipo 1:1 formado por duas moléculas de clioquinol em sua forma aniônica e um grupo *n*-butila coordenados ao íon metálico, com um ligante cloreto como contra-íon. A curva termogravimétrica do complexo (**3**) confirma a presença de duas moléculas de água pela perda de massa de 4,26% (valor teórico: 4,28%) entre 28 °C e 250 °C. Já o complexo (**4**) é neutro e formado por uma molécula de clioquinol sob a forma aniônica, dois ligantes cloretos e um grupo fenila coordenados ao centro metálico. Na curva TG do complexo (**4**) observa-se uma perda de massa de 7,31 % entre 30 °C e 168 °C, que foi atribuída à saída de uma molécula de etanol (teórico: 7,46 %).

Foram obtidos os espectros de massas com ionização por *electronspray* nos modos positivo e negativo para ambos os complexos em solução de metanol. No espectro de massas no modo positivo (ESI(+)-MS) do complexo (**3**) aparece um sinal com  $m/z$  784,7773 que foi atribuído ao íon [*n*-BuSn(QI)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (teórico: 784,78). O espectro no modo negativo mostra um pico-base com  $m/z$  303,8983 atribuído a uma molécula aniônica de clioquinol (teórico: 303,90). Na figura 7.7 estão os espectros de massas do complexo (**3**). No espectro de massas no modo positivo do complexo (**4**) o pico-base com  $m/z$  531,8600 foi atribuído a espécie ([SnPh(QI)]<sup>2+</sup> + MeO<sup>-</sup>) com um valor teórico de  $m/z$  531,86. No modo negativo, o espectro mostra dois sinais mais abundantes com  $m/z$  303,8991 e  $m/z$  607,7403, característicos de uma ( $m/z$  303,90) e duas ( $m/z$  607,80) moléculas de clioquinol aniônicas, respectivamente.

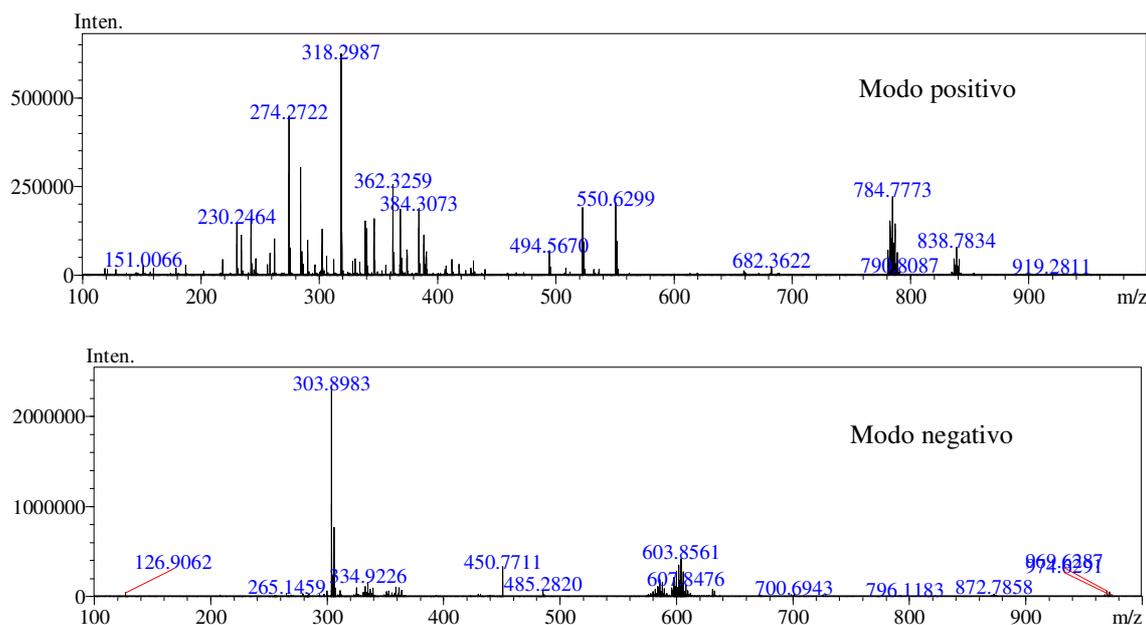


Figura 7.7 - Espectros de massas do complexo  $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) em metanol.

#### Espectroscopia no Infravermelho dos complexos organoestânicos

As atribuições das bandas dos espectros no infravermelho do clioquinol e de seus complexos organoestânicos estão apresentadas na tabela 7.2.2. A figura 7.8 apresenta o espectro do clioquinol e seu complexo  $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**).

A banda forte característica do estiramento  $\nu(\text{O-H})$  em  $3070\text{ cm}^{-1}$  no espectro do clioquinol livre desaparece nos espectros de ambos os complexos, sugerindo a coordenação do clioquinol em sua forma aniônica, o que está de acordo com os dados de microanálises.

Com a coordenação, a banda característica do estiramento  $\nu(\text{C=N})$  em  $1577\text{ cm}^{-1}$  no espectro do clioquinol desloca-se para  $1557\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos (**3**) e (**4**), respectivamente. Deslocamentos significativos ocorrem nas bandas de estiramento  $\nu(\text{C-O})$  e  $\rho(\text{py})$  após a coordenação, que passam de  $1201\text{ cm}^{-1}$  e  $616\text{ cm}^{-1}$  no espectro do clioquinol para  $1111\text{ cm}^{-1}$  e  $1110\text{ cm}^{-1}$  e  $606\text{ cm}^{-1}$  e  $609\text{ cm}^{-1}$  nos espectros dos complexos (**3**) e (**4**), respectivamente, indicando a complexação através os átomos de oxigênio e do nitrogênio heteroaromático<sup>8</sup>.

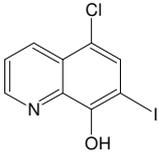
Novas bandas na região de baixa energia nos espectros dos complexos em  $463\text{ cm}^{-1}$  e  $403\text{ cm}^{-1}$  no espectro de **3** foram atribuídas aos estiramentos  $\nu(\text{Sn-O})$  e  $\nu(\text{Sn-N})$ , enquanto que no espectro de **4** novas absorções em  $463\text{ cm}^{-1}$ ,  $402\text{ cm}^{-1}$ ,  $231$  e  $227\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos  $\nu(\text{Sn-O})$ ,  $\nu(\text{Sn-N})$  e  $\nu(\text{Sn-Cl})$  respectivamente<sup>9</sup>. Portanto, os dados de análise elementar, as condutividades

<sup>8</sup> C.C Wagner, S. Calvo, M.H. Torre, E.J. Baran, J. Ramam Spectrosc. 38 (2007) 373.

<sup>9</sup> K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, second ed., Wiley-Interscience, New York, 1970, p.327.

molares e os espectros no infravermelho indicam a formação de complexos organoestânicos penta-coordenados, muito comuns na literatura.<sup>10</sup>

Tabela 7.2.2- Atribuições das principais bandas no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos complexos organoestânicos de clioquinol

Composto							
	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CO})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{MO})$	$\nu(\text{MN})$	$\nu(\text{MCl})$
<b>HQI</b>	<b>3070F</b>	<b>1577m</b>	<b>1202F</b>	<b>616f</b>	-	-	-
$[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> )	-	1557m	1111m	606f	463	403	-
$[\text{SnPh(QI)Cl}_2]\cdot \text{EtOH}$ ( <b>4</b> )	-	1557m	1110m	609f	467	402	231; 227

\*F= forte; m= média; f= fraca.

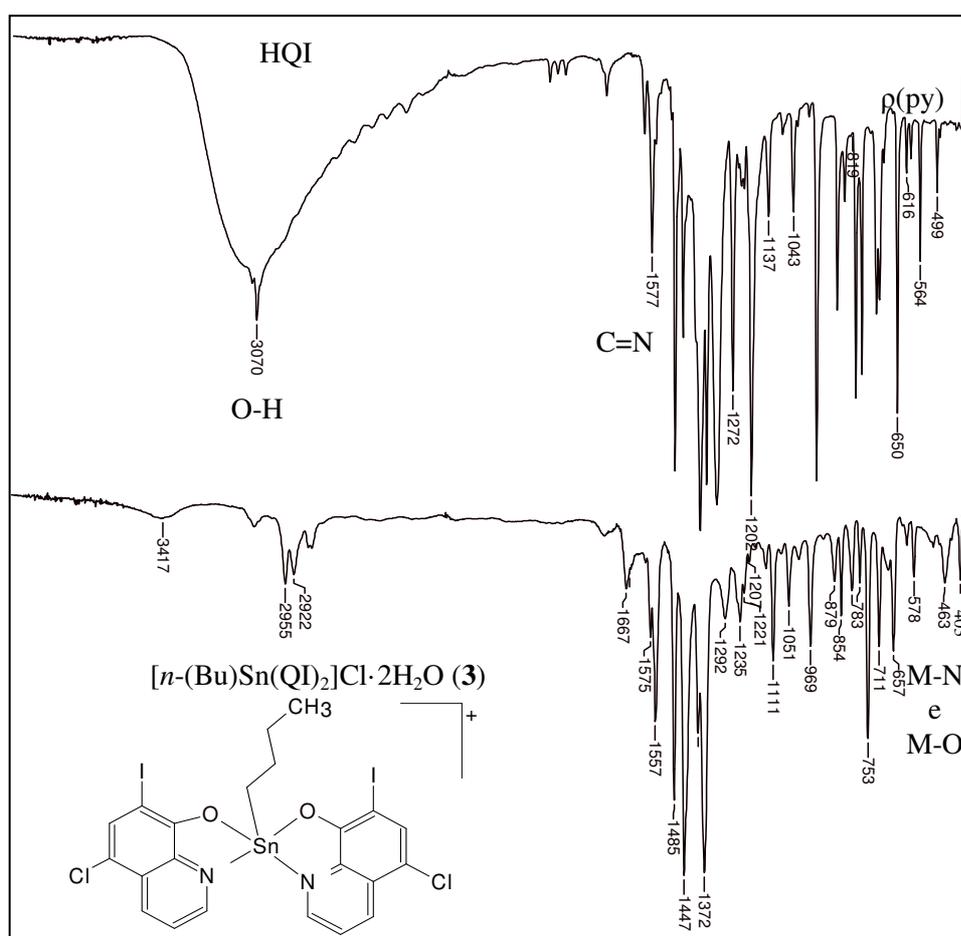


Figura 7.8 – Espectro no infravermelho do clioquinol e seu complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) obtidos em pastilha de KBr,  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

<sup>10</sup> Zia-ur-Rehman, N. Muhammada, S. Ali, I.S. Butler, A. Meetsma, Inorg. Chim. Acta 373 (2011) 187.

*Espectroscopia Mössbauer de  $^{119}\text{Sn}$* 

Os parâmetros na espectroscopia Mössbauer são importantes para fornecer informações como a valência do íon metálico, os tipos de núcleos presentes na amostra e o ambiente estrutural no qual o metal está inserido<sup>11</sup>. O desvio isomérico,  $\delta$ , é diretamente proporcional à densidade eletrônica  $s$  do núcleo de estanho que pode ser afetado por elétrons presentes em outros orbitais. Os valores de  $\delta$  estão entre 0 e 4,0  $\text{mm s}^{-1}$  em relação a  $\text{SnO}_2$  (tomado como valor 0).  $\delta > 0$  significa um aumento na densidade eletrônica  $s$  em relação à referência. Portanto, valores de  $\delta$  entre 0 e 2,0  $\text{mm s}^{-1}$  correspondem espécies contendo núcleos de estanho(IV), enquanto que valores de  $\delta > 2,0 \text{ mm s}^{-1}$  correspondem a núcleos de estanho(II). O desdobramento quadrupolar,  $\Delta$ , refere-se à assimetria na distribuição eletrônica no átomo de estanho. Assim para compostos com distribuição perfeitamente simétrica, como o  $\text{SnCl}_4$ , o valor de  $\Delta$  é nulo. Dessa forma, a quantidade e o tipo de ligantes coordenados ao estanho podem provocar o aparecimento de um quadrupolo nuclear. Dessa forma, quanto maior o número de coordenação do complexo, maior será o valor de  $\Delta$ .<sup>12</sup>

Os valores de  $\delta$  e  $\Delta$  para os complexos  $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) e  $[\text{SnPh}(\text{QI})\text{Cl}_2]\cdot \text{EtOH}$  (**4**) e de alguns sais de partida usados como referência estão dispostos na tabela 7.2.3. A figura 7.9 mostra os espectros Mössbauer de  $^{119}\text{Sn}$  dos complexos (**3**) e (**4**) a 80 K. As linhas das curvas indicam a presença de um único sítio de estanho em cada composto. Os baixos valores de  $\delta$  dos complexos indicam a presença de núcleos de estanho(IV) e que, pela complexação, ocorreu um aumento no número de coordenação do estanho, de quatro em  $[(n\text{-Bu})\text{SnCl}_3]$  e  $[\text{SnPhCl}_3]$  para cinco nos complexos (**3**) e (**4**), respectivamente. O caráter  $s$  passa de 25% (hibridação  $sp^3$ ) nos sais de partida a 20% (hibridação  $sp^3d$ ) nos complexos. O aparecimento do desdobramento quadrupolar em relação ao  $\text{SnCl}_4$  indica uma assimetria na distribuição de densidade eletrônica ao redor do metal. Outra informação interessante que reforça a proposta de penta-coordenação é o valor da razão  $\rho$  ( $\Delta/\delta$ ) em complexos organoestânicos. Valores  $> 2,0$  indicam um número de coordenação de estanho superior a quatro. Nos casos de **3** e **4** esses valores são iguais a 2,51 e 2,44, respectivamente.

Como mostrado na tabela 7.2.3, a presença dos grupos *n*-butil ou fenil não dá lugar a diferenças significativas nos parâmetros Mössbauer de **3** e **4**.

<sup>11</sup> L.Pellerito, L. Nagy, Coord. Chem. Rev. 224 (2002) 111.

<sup>12</sup> C.A.L. Filgueiras, Quim. Nova, 21(2) (1998) 176.

Tabela 7.2.3- Parâmetros hiperfinos Mössbauer dos complexos organoestânicos de clioquinol e alguns sais usados como referência

Composto	$\delta$ (mm s <sup>-1</sup> ) ( $\pm 0,05$ )	$\Delta$ (mm s <sup>-1</sup> ) ( $\pm 0,05$ )	* $\Gamma$ (mm s <sup>-1</sup> ) ( $\pm 0,02$ )	Area (%) ( $\pm 1$ )
(3)	0,73	1,83	0,90	100
(4)	0,75	1,83	0,88	100
SnCl <sub>4</sub> <sup>10</sup>	0,82	0		
BuSnCl <sub>3</sub> <sup>13</sup>	1,31	1,83		
PhSnCl <sub>3</sub> <sup>14</sup>	1,10-1,47	1,5-1,84		

\* $\Gamma$ : Largura da banda à meia-altura, que está relacionado à meia-vida do estado nuclear excitado ( $\Gamma$  para o estanho = 0,80-1,20 mm s<sup>-1</sup>)

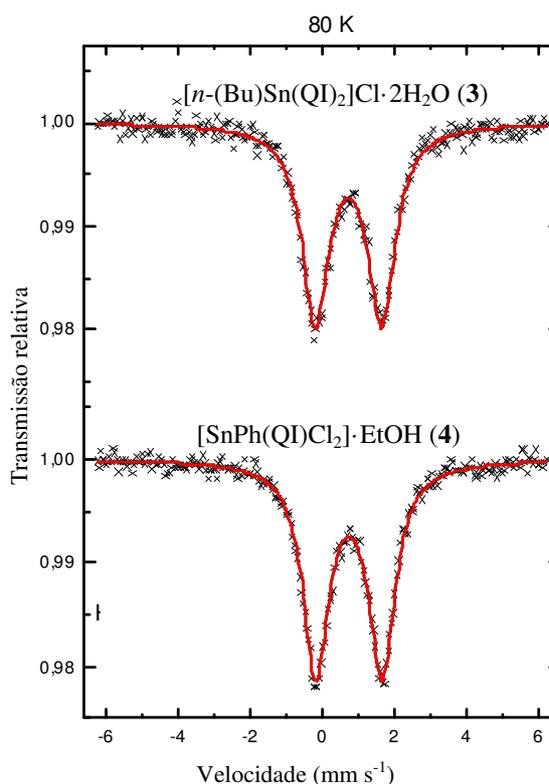


Figura 7.9 - Espectros Mössbauer de <sup>119</sup>Sn dos complexos [n-(Bu)Sn(QI)<sub>2</sub>]Cl·2H<sub>2</sub>O (3) e [SnPh(QI)Cl<sub>2</sub>]·EtOH (4) a 80 K.

#### Espectroscopia eletrônica dos complexos organoestânicos

O espectro eletrônico do clioquinol livre apresenta duas bandas, sendo uma em torno de 259 nm ( $5,50 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e outra em 334 nm ( $\epsilon = 5,65 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) atribuídas às transições  $n \rightarrow \pi^*$  do anel da piridina e dos grupos CN e CO, respectivamente<sup>15</sup>.

<sup>13</sup> 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.

<sup>14</sup> R. Barbieri, L. Pellerito, N. Bertazzi, G. C. Stocco, Inorg. Chim. Acta, 11 (1974) 173.

<sup>15</sup> M. Carcelli, S. Ianelli, L. Mavilla, C. Pelizzi, G. Pelizzi, Inorg. Chim. Acta 245 (1996) 43.

Com a coordenação ao *n*-butilestanho(IV) verifica-se o deslocamento das referidas bandas para 274 nm ( $\epsilon = 7,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e 344 nm ( $\epsilon = 6,77 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). No espectro do complexo [*n*-(Bu)Sn(QI)<sub>2</sub>]Cl·2H<sub>2</sub>O (**3**) observa-se o surgimento de uma banda em 396 nm ( $\epsilon = 7,40 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) atribuída a uma transição de transferência de carga entre orbitais do ligante e do metal.

Após a coordenação ao fenilestanho(IV) as bandas sofrem deslocamento para 279 nm ( $\epsilon = 2,99 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e 329-346 nm ( $\epsilon = 1,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A banda característica de transição de transferência de carga entre orbitais do ligante e do metal surge em 399 nm ( $\epsilon = 2,74 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A figura 7.10 apresenta os espectros eletrônicos do clioquinol livre e seus complexos organoestânicos.

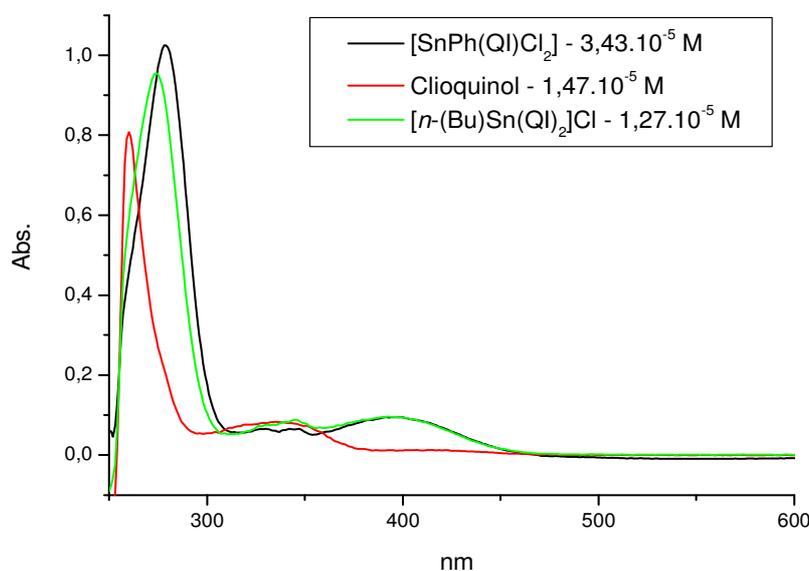


Figura 7.10 - Espectros eletrônicos de HQI, [*n*-(Bu)Sn(QI)<sub>2</sub>]Cl·2H<sub>2</sub>O (**3**) e [SnPh(QI)Cl<sub>2</sub>]·EtOH (**4**).

#### Ressonância Magnética Nuclear dos complexos organoestânicos

As atribuições dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) dos complexos de organoestânicos encontram-se na tabela 7.2.4. Após a coordenação, os sinais de <sup>1</sup>H dos anéis aromáticos dos complexos sofrem deslocamentos significativos, sugerindo a coordenação através dos átomos de oxigênio e nitrogênio. O desaparecimento do sinal do hidrogênio de O–H, situado no espectro do clioquinol livre em 11,03 ppm, indica a coordenação do clioquinol em sua forma aniônica. Na figura 7.11 encontram-se os espectros de RMN de <sup>1</sup>H do clioquinol livre e de seu complexo [SnPh(QI)Cl<sub>2</sub>]·EtOH (**4**) em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Tabela 7.2.4- Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol e seus complexos de organoestânicos em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz

Composto	Atribuições (M)				
	n° ( $\text{DMSO-}d_6$ )				
	H2 (d*) 1	H3 (t*) 1	H4 (d*) 1	H6 (s) 1	C8-OH
HQI	8,95-8,92	7,76-7,70	8,46-8,41	7,95	11,03
$[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)	8,72-8,68	7,93-7,86	8,68-8,64	8,16	-
$[\text{SnPh(QI)Cl}_2]\cdot \text{EtOH}$ (4)	9,55	8,12	8,97	8,23	-

\* Desdobramento padrão; no entanto, devido à sobreposição de sinais são apenas observados multipletos.

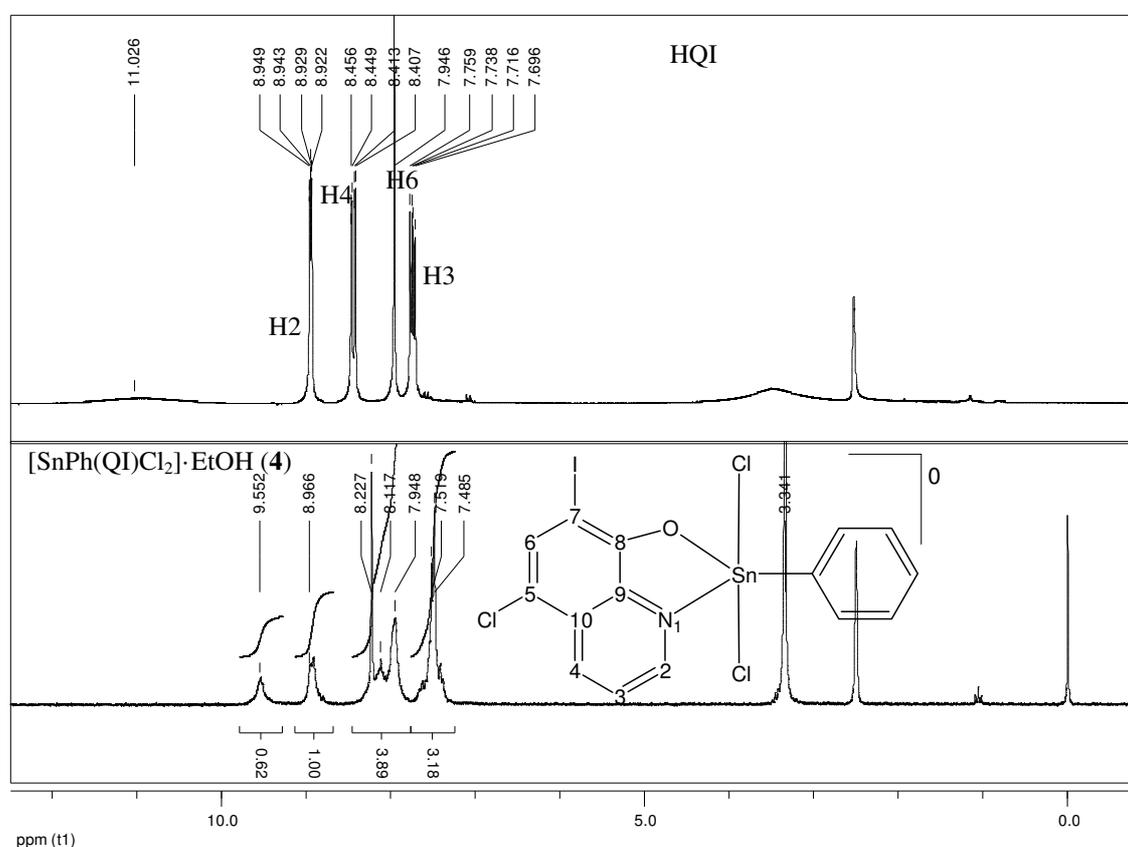


Figura 7.11 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol (HQI) e do complexo  $[\text{SnPh(QI)Cl}_2]\cdot \text{EtOH}$  (4) em  $\text{DMSO-}d_6$ , 200 MHz.

No espectro do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3) aparecem sinais com 20% de abundância que não são coincidentes com os sinais do ligante livre, sugerindo interação com o solvente ou a formação de outras espécies. Para descartar uma possível interação com o solvente, foram realizados experimentos de RMN em  $\text{CDCl}_3$ . Os mesmos sinais permanecem, sugerindo assim que a interação com o DMSO não seria responsável pela presença de sinais duplicados.

Na tabela 7.2.5 encontram-se as atribuições dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol e seus complexos organoestânicos em  $\text{CDCl}_3$ . Não foram observados sinais de acoplamento  $^1J(^1\text{H}-^{119}\text{Sn})$  e  $^1J(^{13}\text{C}-^{119}\text{Sn})$ . Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos (3) e (4) em  $\text{CDCl}_3$  observam-se os deslocamentos dos sinais do clioquinol e o surgimento dos sinais do grupo orgânico proveniente do sal de partida. No espectro de 3 surgem sinais na região de campo alto característicos do grupo *n*-butila. A proporção do grupo *n*-butila em relação à porção do clioquinol é 1:2 (*n*-Bu:QI), o que está coerente com a proposta conforme a análise elementar e o espectro de massas. No espectro do complexo (4) surgem sinais em torno de 7 ppm característicos do grupo fenila em uma proporção de 1:1 em relação aos sinais do clioquinol, concordando com a proposta feita pela análise elementar.

As figuras 7.12 e 7.13 mostram seções expandidas dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e dos mapas de contorno HMBC do complexo (3) a 300 K em  $\text{CDCl}_3$ . O símbolo (') usado nos sinais das figuras 7.13 e 7.16 refere-se a uma espécie não majoritária em solução.

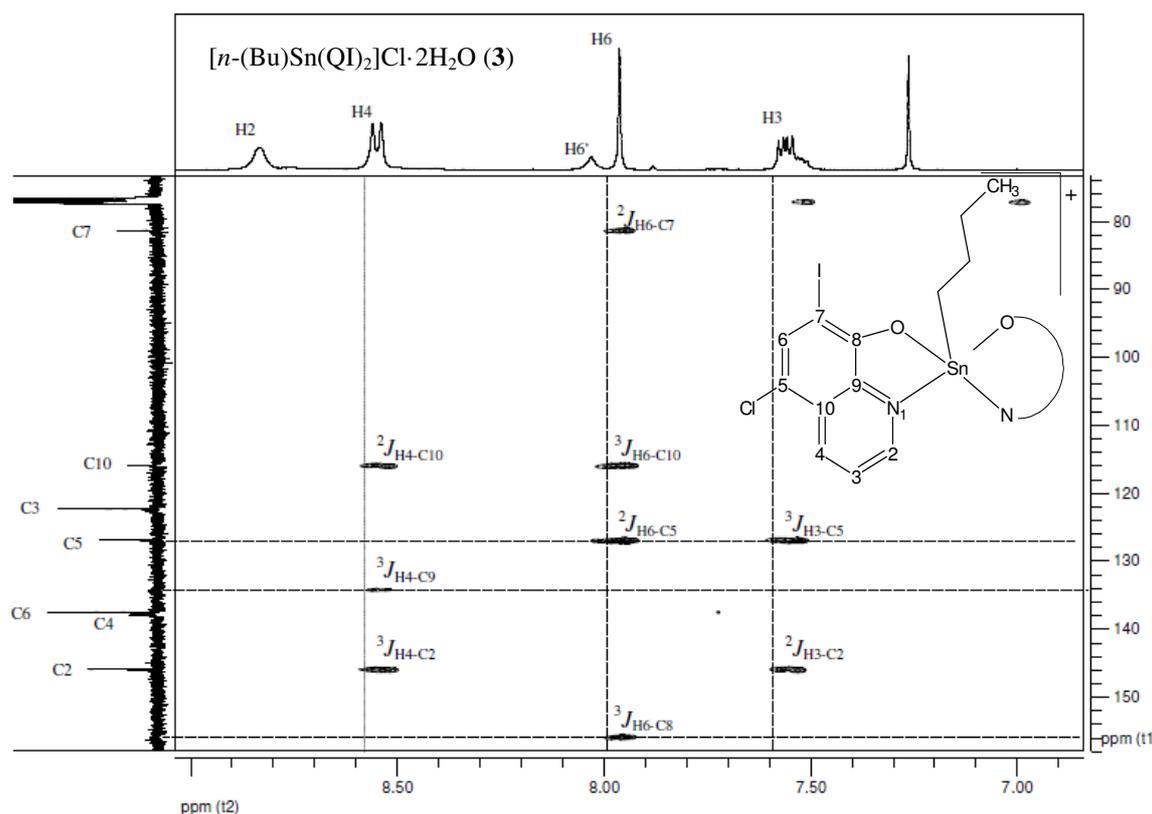


Figura 7.12 - Mapa de contorno HMBC do complexo  $[\text{n}-(\text{Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3) em  $\text{CDCl}_3$  a 300 K, 400 MHz.

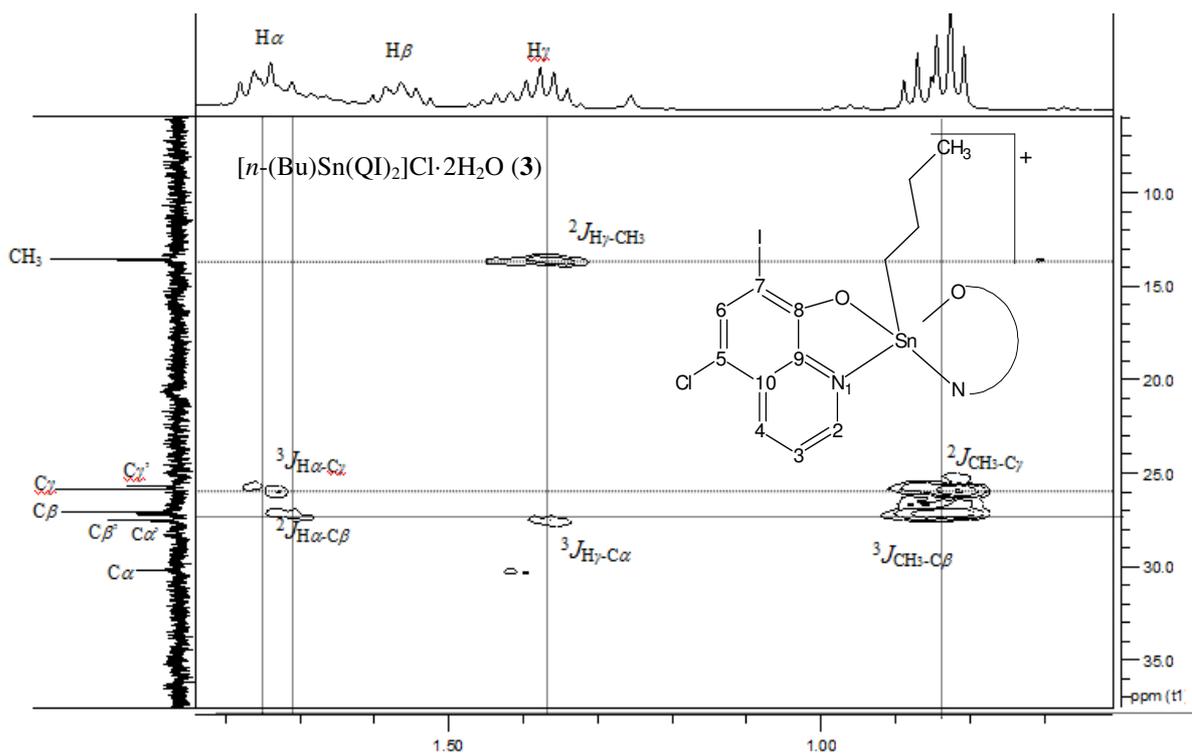
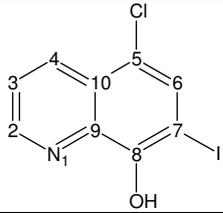


Figura 7.13 - Mapa de contorno HMBC do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3) em  $\text{CDCl}_3$  a 300 K, 400 MHz.

Tabela 7.2.5- Atribuições, número de hidrogênios ( $n^\circ$ ), deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  do clioquinol e seus complexos organoestânicos em  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

Composto								
	H2 (d*) 1	H3 (t) 1	H4 (d) 1	H6 (s) 1	Hα (t*) 2	Hβ (dt*) 2	Hγ (m*) 2	CH <sub>3</sub> (t) 3
$[(n\text{-Bu)SnCl}_3]$	-	-	-	-	2,45- 2,38	1,98- 1,83	1,56- 1,41	1,02- 0,95
HQI	8,84- 8,81	7,64- 7,57	8,54- 8,50	7,89	-	-	-	-
(3)	8,83	7,57- 7,54	8,56- 8,54	7,96	1,78- 1,71	1,60- 1,52	1,47- 1,34	0,89- 0,81
(4)	8,78- 8,75	8,11	7,73- 7,68	7,56	-	-	-	-

\* Desdobramento padrão, no entanto, devido à sobreposição de sinais são apenas observados multipletos.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO}-d_6$  e  $\text{CDCl}_3$  dos complexos (3) e (4), todos os sinais do clioquinol sofrem deslocamentos significativos com a coordenação. Os sinais dos carbonos C8-O e

C9 foram atribuídos a partir dos sinais nos mapas de correlação HMBC. C8 e C9, próximos aos átomos coordenantes O e N, respectivamente, são os que mais se deslocam. Isto sugere a coordenação do ligante no modo bidentado. Na tabela 7.2.6 encontram-se as atribuições dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  do clioquinol e seus complexos de estanho(IV) em  $\text{CDCl}_3$  a 300 K. No espectro do complexo  $[\text{n}-(\text{Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) todos os sinais estão duplicados e mostram diferentes intensidades, sugerindo a presença de mais de uma espécie em solução, sendo que uma delas é majoritária a 300K (ver Figuras 7.14 e 7.15).

Os espectros de RMN de  $^{119}\text{Sn}$  foram obtidos em  $\text{CDCl}_3$ . Nos espectros de **3** e **4** aparecem dois sinais, em -404 ppm e -518 ppm em **3** e em -33 ppm e -520 ppm em **4**, indicando a presença de duas espécies em solução. Os deslocamentos químicos dos sinais de  $^{119}\text{Sn}$  do complexo (**3**) são próximos sugerindo o mesmo número de coordenação de ambas as espécies. Apesar de o espectro RMN de  $^{119}\text{Sn}$  do complexo (**4**) mostrar dois sinais bem diferentes, não foi possível visualizar espécies isoméricas em seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

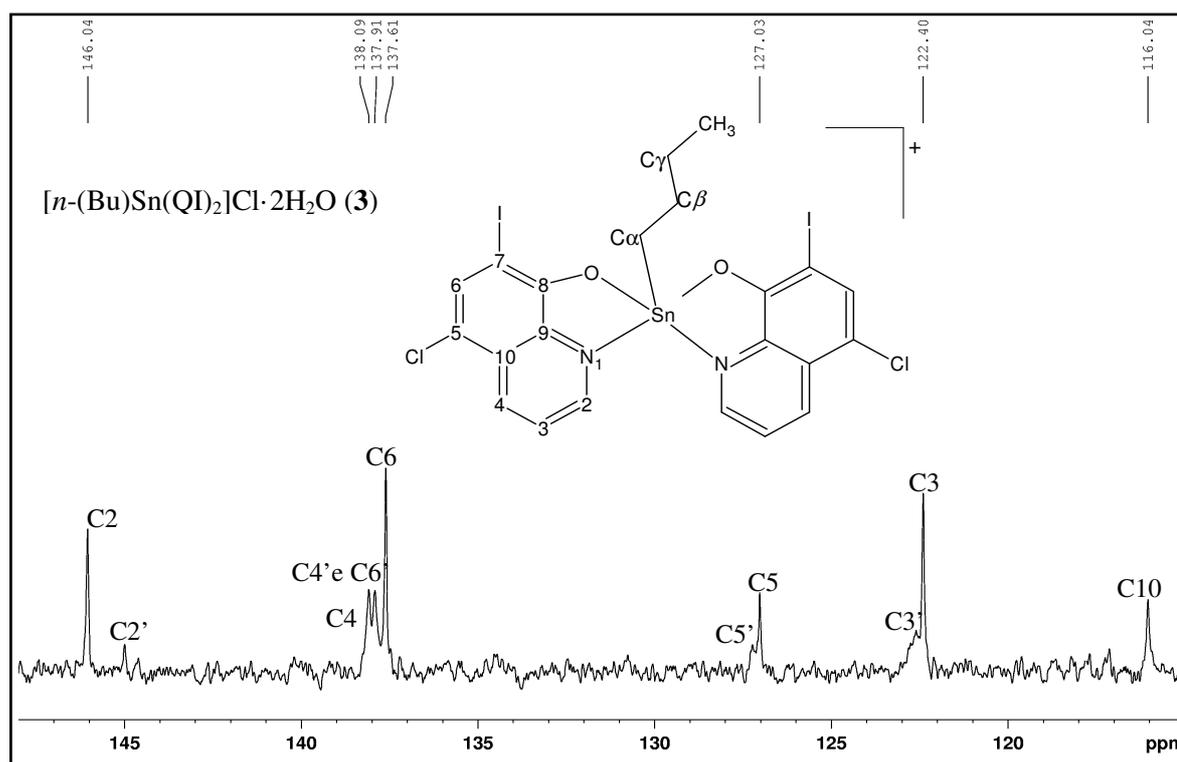


Figura 7.14 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  entre 148-115 ppm do complexo  $[\text{n}-(\text{Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) em  $\text{CDCl}_3$  a 300 K, 400 MHz.

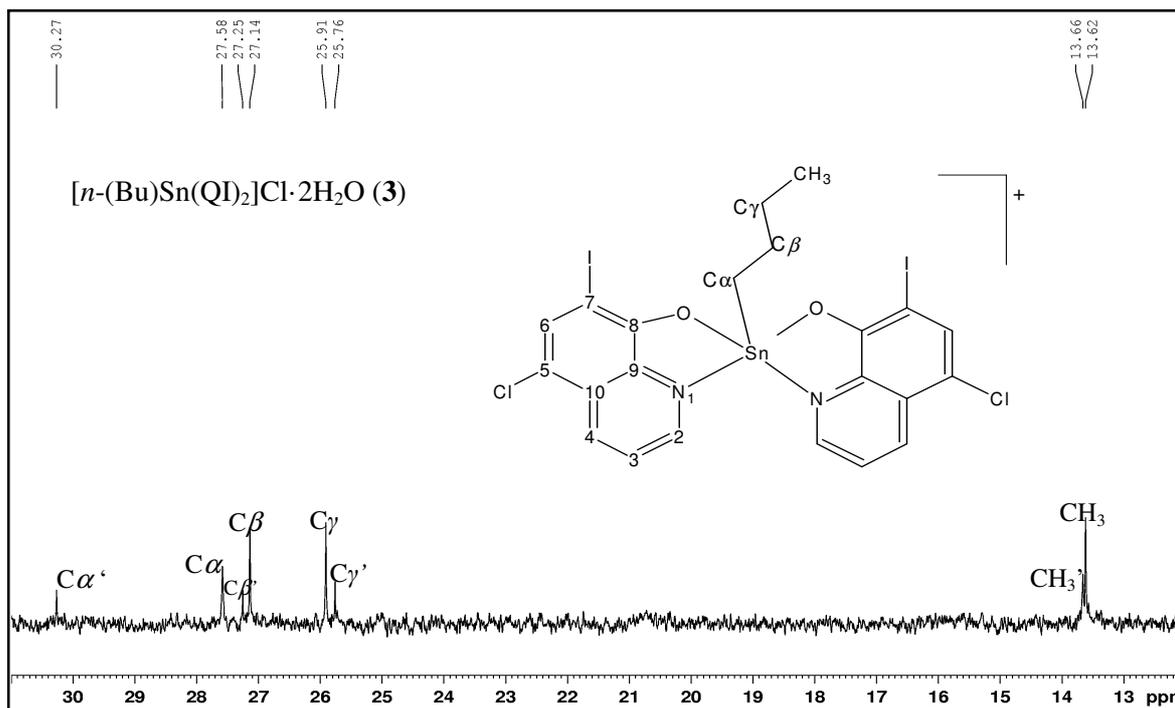
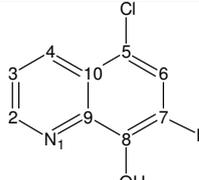


Figura 7.15 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  entre 31-12 ppm do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3) em  $\text{CDCl}_3$  a 300 K, 400 MHz.

Tabela 7.2.6- Atribuições e deslocamentos químicos ( $\delta$  ppm) sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do clioquinol livre e seus complexos organoestânicos ( $\text{CDCl}_3$ ), 400 MHz

				
Atribuições	DEPT	HQI	(3)	(4)
<b>C2</b>	↑	148,85	146,04	146,65
<b>C3</b>	↑	122,84	122,40	124,17
<b>C4</b>	↑	137,02	138,09	139,74
<b>C5</b>	-	126,09	127,03	128,43
<b>C6</b>	↑	134,07	137,61	136,35
<b>C7</b>	-	75,66	81,68	84,04
<b>C8-O</b>	-	152,21	155,61	169,43
<b>C9</b>	-	135,39	133,43	133,12
<b>C10</b>	-	121,29	116,04	119,64
Atribuições	DEPT	$[(n\text{-Bu)SnCl}_3]$	(3)	
<b>C<math>\alpha</math>; C<math>\alpha'</math></b>	↓	28,04	27,58; 30,27	
<b>C<math>\beta</math>; C<math>\beta'</math></b>	↓	26,74	27,14; 27,25	
<b>C<math>\gamma</math>; C<math>\gamma'</math></b>	↓	25,60	25,91; 25,76	
<b>CH<math>_3</math>; CH<math>_3'</math></b>	↑	12,02	13,62; 13,66	

Uma vez que foi descartada a coordenação do DMSO ao centro de estanho(IV) quando o complexo (3) é dissolvido já que os mesmos sinais duplicados aparecem em  $\text{CDCl}_3$ , duas espécies poderiam coexistir na solução (tanto de DMSO quanto de  $\text{CDCl}_3$ ). Para estanho(IV) com número de coordenação 5 as geometrias de pirâmide de base quadrada e trigonal bipiramidal poderiam em princípio estar presentes. No entanto, várias estruturas isoméricas poderiam ser consideradas, conforme a Figura 7.16 abaixo:

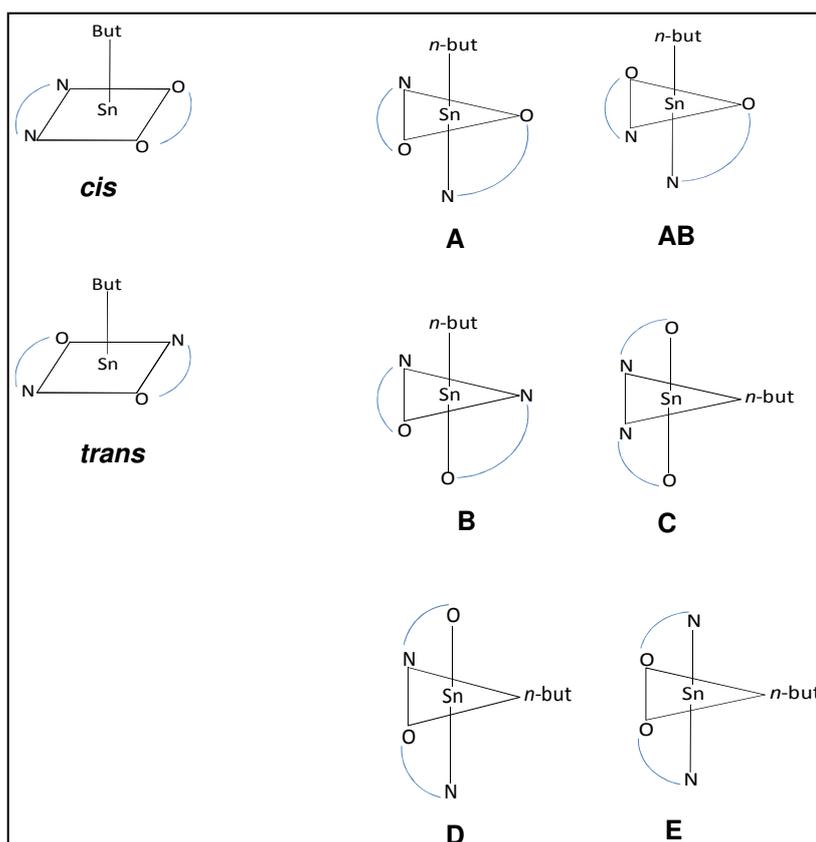


Figura 7.16 - Possíveis estruturas e geometrias adotadas pelo complexo  $[\text{n-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3).

A partir desses resultados, realizou-se uma série de experimentos de RMN do complexo (3) em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz) em diferentes temperaturas (273 K, 300 K e 325 K) para investigar o equilíbrio dessas espécies em solução. No entanto, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , a proporção de 1:2,75 entre as espécies majoritárias, calculada a partir da relação de integrações dos sinais de  $\text{H6}'$  e  $\text{H6}$ , permanece praticamente a mesma nas diferentes temperaturas.

A razão entre os sinais do grupo *n*-butila e do clioquinol também permanece a mesma (1:2) em diferentes temperaturas. No entanto, com o resfriamento a 273 K ocorre o surgimento de outros sinais (mais evidentes nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ ). As diferentes espécies em solução em temperaturas mais elevadas estão em movimentos rotacionais mais rápidos de forma que a localização dos sinais dos espectros nessas temperaturas é uma média dos deslocamentos químicos de cada um, sendo então observados menos sinais que a baixas temperaturas. Em baixas temperaturas as rotações

são mais restritas e assim os sinais estão mais deslocados. As figuras 7.17 a 7.20 mostram os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do complexo (**3**) em diferentes temperaturas.

Após os experimentos em diferentes temperaturas foi realizado novamente um RMN de  $^1\text{H}$  a 300 K para verificar a possibilidade de decomposição da amostra pelo aquecimento. A amostra não sofreu decomposição já que o espectro é semelhante ao primeiro obtido a 300 K. Assim, a variação da temperatura parece provocar diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais sem decompor a amostra. Com essas informações pode-se concluir que as espécies isoméricas não sofrem interconversão dentro dessa faixa de temperatura, já que as proporções dos sinais são as mesmas.

Não foi possível atribuir a que espécies os sinais de RMN se referem com as técnicas aqui utilizadas. Cálculos teóricos DFT estão sendo realizados, os quais possivelmente fornecerão mais dados para que uma atribuição inequívoca possa ser feita.

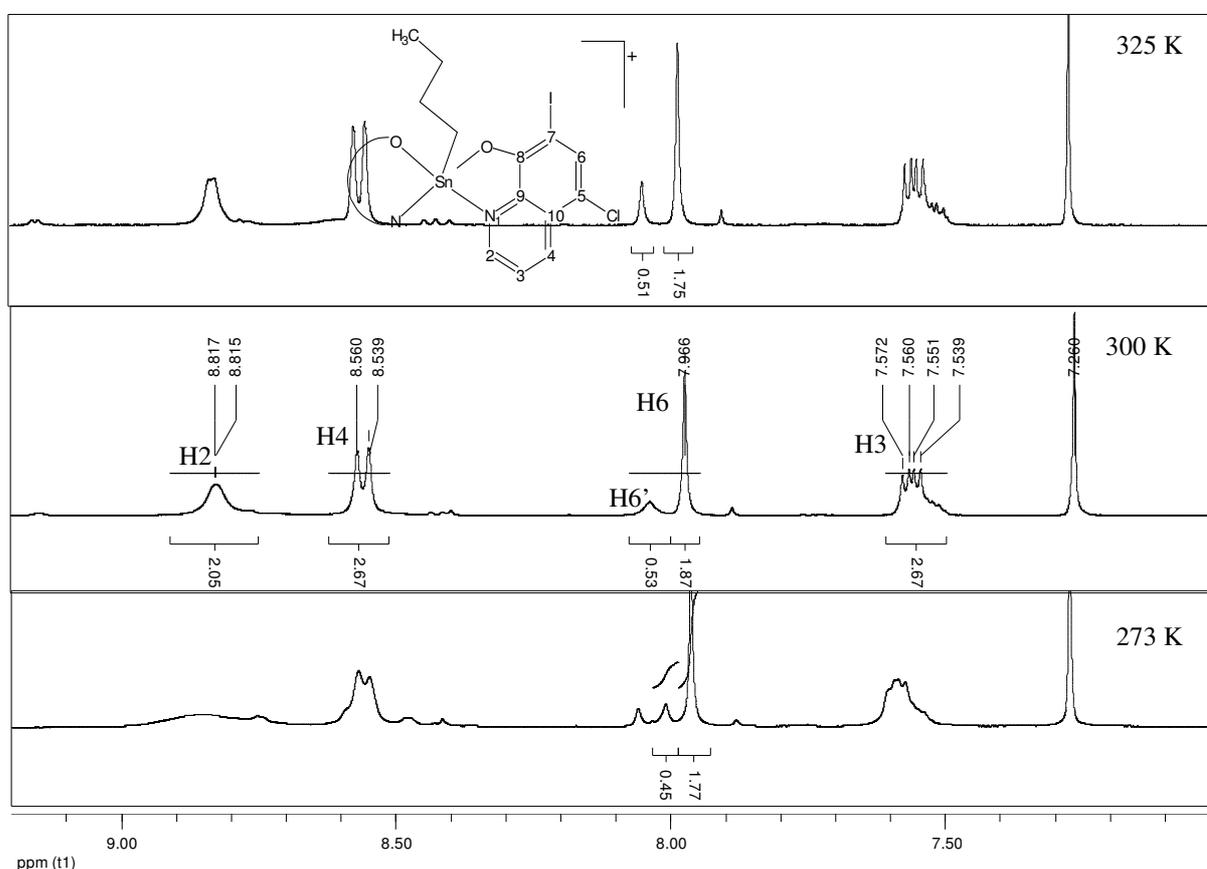


Figura 7.17 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  entre 9,2-7,0 ppm do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2\text{Cl}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) em  $\text{CDCl}_3$  a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.

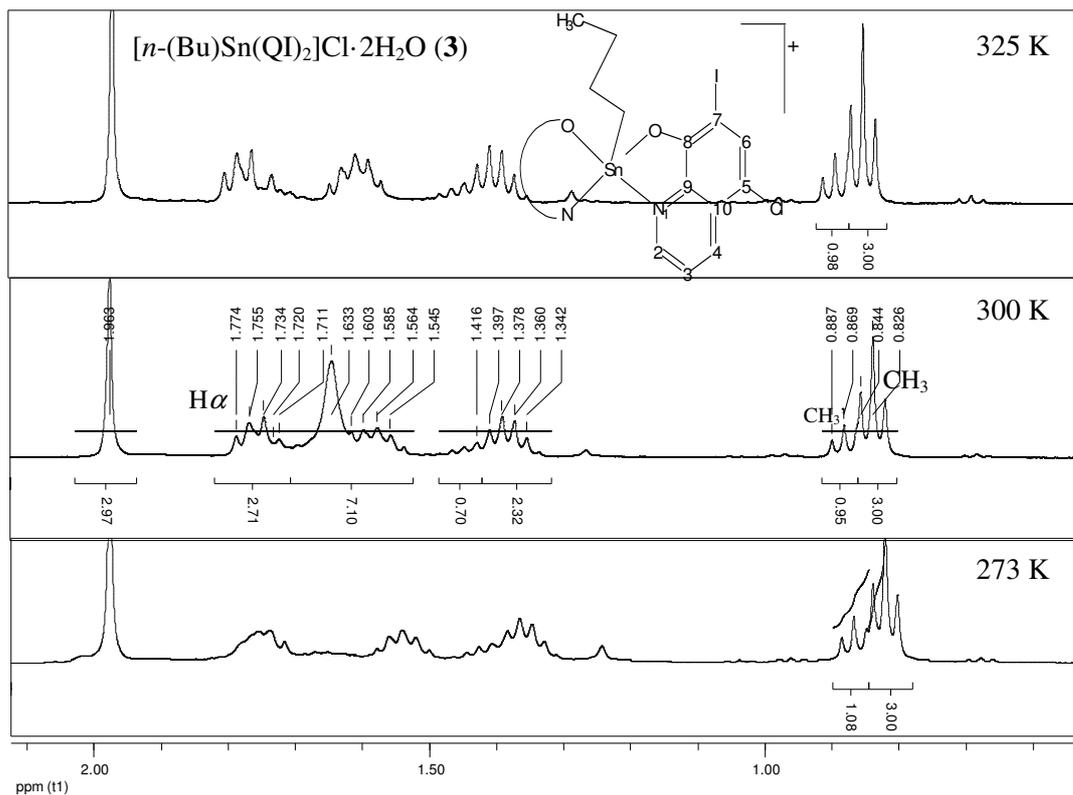


Figura 7.18 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  entre 2,1-0,5 ppm do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3) em  $\text{CDCl}_3$  a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.

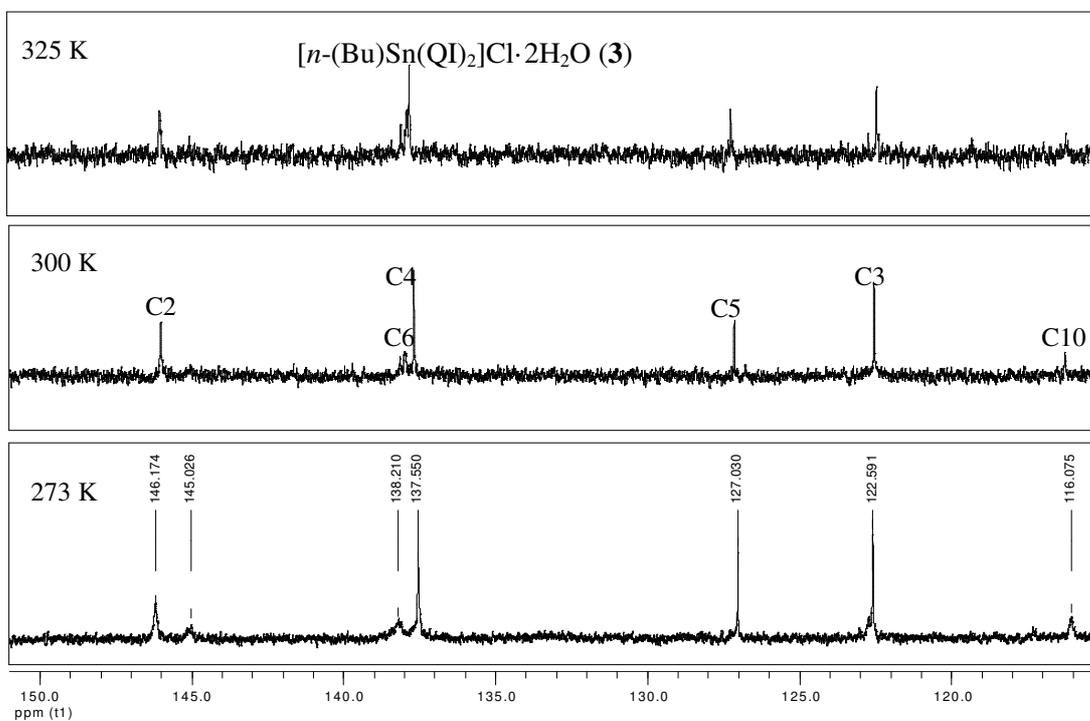


Figura 7.19 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  entre 151-115 ppm do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3) em  $\text{CDCl}_3$  a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.

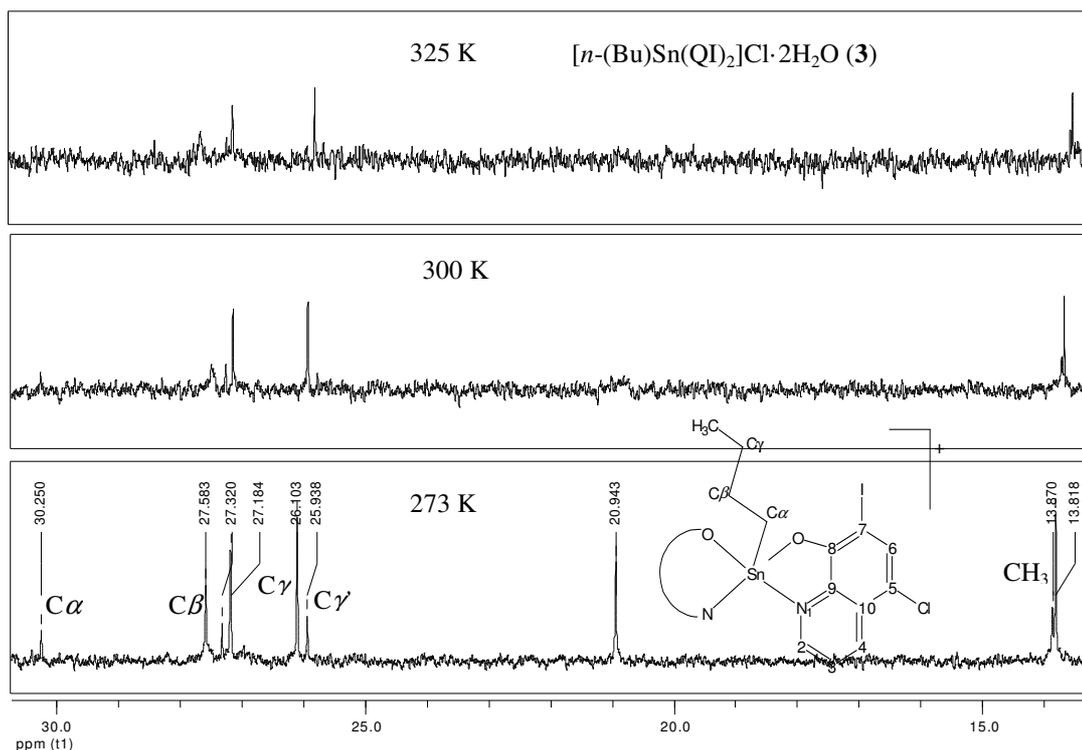


Figura 7.20 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  entre 31-12 ppm do complexo  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**3**) em  $\text{CDCl}_3$  a diferentes temperaturas (325 K, 300 K e 273 K), 400 MHz.

## 7.2.2 – Atividade Biológica

### 7.2.2.1 – Atividade antimicrobiana utilizando o método de macrodiluição

A atividade antimicrobiana dos complexos  $[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}$  (**3**) e  $[\text{SnPh(QI)Cl}_2]$  (**4**) foi avaliada contra cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Candida albicans*), de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (Capítulo 2, seção 2.5).

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos estão listados na tabela 7.2.2.1, juntamente com os valores para o cloridrato de tetraciclina e o fluconazol, utilizados como referência.

Tabela 7.2.2.1 – Valores de CIM em  $\mu\text{M}$  para o clioquinol livre e seus complexos organoestânicos

Composto	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 6358
Clioquinol	4,3	33,7	23,7
$[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> )	0,4	>156,6	19,2
$[\text{SnPh(QI)Cl}_2]\cdot \text{EtOH}$ ( <b>4</b> )	0,7	171,7	>278,1
Fluconazol	72,7	-	-
Tetraciclina	-	66,9	0,5
$n\text{-(Bu)SnCl}_3$	>2662,9	>1731,2	>1731,2
$\text{SnPhCl}_3$	81,7	72,0	> 700,5

Pelos valores obtidos de CIM observa-se que a coordenação aos sais organoestânicos provoca um aumento na atividade antifúngica, mas não se revelou uma estratégia interessante com relação à atividade antibacteriana. Este resultado pode estar relacionado à atividade do próprio clioquinol que é um agente antifúngico. No entanto, a atividade dos complexos contra *C. albicans* foi cerca de dez vezes maior que a atividade do clioquinol livre, sendo este último mais ativo que o fluconazol. Essa atividade pode ser atribuída aos complexos, já que tanto os sais de partida quanto o clioquinol foram menos ativos. Isso sugere que a coordenação ao *n*-butilestanho(IV) e fenilestanho(IV) seria uma boa estratégia para aumentar a atividade antifúngica dessa classe de compostos.

#### 7.2.2.2 – Atividade antifúngica utilizando o método de microdiluição

A partir dos resultados revelados pelos complexos contra o crescimento de fungos *C. albicans*, foi avaliada sua atividade antifúngica contra quatro espécies de *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*), utilizando o método de micro-diluição. Os resultados aparecem na tabela 7.2.2.2.

Tabela 7.2.2.2 - Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{M}$  frente às diferentes espécies de *Candida spp.*

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HQI	6,55	6,55	3,27	6,55
$[n\text{-(Bu)Sn(QI)}_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( <b>3</b> )	1,17	2,33	1,17	4,67
$[\text{SnPh(QI)Cl}_2]\cdot \text{EtOH}$ ( <b>4</b> )	6,48	6,48	3,24	3,24
$(n\text{-Bu)SnCl}_3$	NA	NA	NA	NA
$\text{SnPhCl}_3$	211,92	211,92	423,62	211,92
Fluconazol	6,53	104,5	6,53	6,53

\*NA = não ativo

O complexo (**3**) foi mais ativo que o clioquinol livre e o fluconazol frente a todas as espécies de *Candida* enquanto que o sal  $[(n\text{-Bu)SnCl}_3]$  não se mostrou ativo. (**3**) foi aproximadamente seis vezes mais ativo que o clioquinol livre e que o fluconazol frente a *C. albicans*. O complexo (**3**) revelou-se três vezes mais ativo que o clioquinol e seis vezes mais ativo que o fluconazol contra o crescimento de *C. glabrata*. Esses resultados mostram a eficácia da coordenação ao *n*-butilestanho(IV) como estratégia para o aumento da atividade antifúngica do clioquinol.

A atividade de **4** foi semelhante à do clioquinol exceto contra o crescimento de *C. parapsilosis* onde se mostrou duas vezes mais ativo. No entanto, quando comparado ao fluconazol, o complexo (**4**) foi mais ativo frente às cepas *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e mostrou atividade semelhante contra *C. albicans*. O sal de partida  $[\text{SnPhCl}_3]$  revelou baixa atividade antifúngica, com valores de CIM superiores a 211,92  $\mu\text{M}$ .

Dessa forma, a atividade do complexo (**3**) contra as diferentes espécies de *Candida* e de **4** contra *C. parapsilosis* podem ser atribuídas aos complexos, já que estes foram mais ativos que o ligante livre e o sal de partida. O complexo (**3**) é formado por duas moléculas de clioquinol, o que não

é suficiente para atribuir a atividade apenas ao ligante, pois a atividade do complexo contra *C. albicans* e *C. krusei* foi cerca de três vezes superior à do ligante livre. Essa mesma observação pode ser feita para a atividade do complexo (4) contra *C. parapsilosis*, pois o complexo contendo apenas uma molécula de clioquinol foi duas vezes mais ativo que o clioquinol livre.

#### 7.2.2.3 - Teste de combinação terapêutica

As espécies de *Candida* são os fungos patogênicos mais comuns, sendo *C. albicans* responsável por mais de 50% de todas as infecções<sup>16</sup>. Cepas de *C. albicans* são tipicamente suscetíveis ao fluconazol e a outros antifúngicos azólicos, mas há relatos do aumento da resistência, especialmente em hospedeiros infectados pelo HIV submetidos a cursos repetidos da terapia antifúngica com azóis. A questão da resistência aos medicamentos torna-se um desafio devido ao número restrito de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções invasivas causadas por fungos.<sup>17</sup>

A terapia de combinação de fármacos tem sido amplamente usada em vários campos da medicina. Apesar dos avanços no desenvolvimento de várias drogas antifúngicas e na terapia, a micose continua a ser difícil de tratar. O efeito aditivo entre fármacos não é um conceito novo e a combinação de dois ou mais fármacos pode resultar em maior eficácia, velocidade de ação, um espectro de atividade mais amplo e melhor tolerabilidade pelo paciente<sup>18</sup>. Além disso, a combinação pode permitir a penetração do fármaco complementar em áreas de tecido infectado onde cada fármaco por si só não conseguiria agir. Diante da patogenicidade apresentada por cepas de *C. albicans* e da resistência apresentada por essas cepas a medicamentos, o estudo do efeito da combinação de compostos com atividade contra o esse tipo de microorganismo mostra-se interessante.

Foram avaliadas as seguintes combinações: clioquinol/fluconazol (HQI/fluco), complexo (3)/fluconazol (3/fluco) e complexo (4)/fluconazol (4/fluco) frente às diferentes cepas de *C. albicans*. A tabela 7.2.2.3 apresenta os valores de concentração inibitória fracionária (CIF) para as combinações com o fluconazol frente à diferentes cepas de *C. albicans*.

A combinação (3/fluco) mostrou um efeito aditivo contra a maioria das cepas testadas (CIF média foi de 0,87), enquanto que este efeito foi observado por 50% das cepas testadas com a combinação (4/fluco) (CIF média = 1,03). Para a combinação (HQI/fluco) o efeito foi aditivo em apenas cinco cepas, mas a média de CIF foi de 0,96, particularmente em razão dos baixos valores de CIF contra as cepas 064-CH/BO/VD e 022-CH/BO/VD.

Combinações (3/fluco) e (4/fluco) provaram ser mais potentes do que a combinação (HQI/fluco) contra as cepas ATCC 18.804, 038-SB/BO e 076-CH/BO/VD. (3/fluco) foi mais potente

<sup>16</sup> B.E. Mansfield, H.N. Oltean, B.G. Oliver, S.J. Hoot, S.E. Leyde, L. Hedstrom, T.C. White. *Pathogens*, 6 (2010) 1.

<sup>17</sup> J.W.M. van der Meer, F. van de Veerdonk, L.A.B. Joosten, B-J. Kullberg, M.G. Netea. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 36S (2010) S58.

<sup>18</sup> J.H. Olafsson, B. Sigurgeirsson, R. Baran Combination. *Br. J. Dermatol.* 149 (2003) 15.

que (HQI/fluco) contra seis cepas enquanto (4/fluco) foi mais ativo que (HQI/fluco) contra cinco cepas. Em muitos casos, o efeito passou de indiferente em (HQI/fluco) para aditivo nas combinações (3/fluco) e (4/fluco).

Em geral os valores de CIF foram considerados como um indicativo de um efeito aditivo. No entanto, diferenças intrínsecas das cepas resultaram em perfis de susceptibilidade distintos para as combinações testadas.

Tabela 7.2.2.3 - Concentração inibitória fracionada (CIF) frente a diferentes cepas de *C. albicans*

<i>C. albicans</i>	CIF HQI	CIF (3)	CIF (4)
ATCC 18804	1, 125	0, 922	0,98
038-SB/BO	1, 125	0, 875	0,96
076-CH/BO/VD	0, 914	0, 539	0,83
093-SB/BO/RG	0, 734	0, 988	1,11
064-CH/BO/VD	0, 569	0, 519	1,09
022-CH/BO/VD	0, 664	0, 664	0,91
030-CH/BO/VD	1, 194	1, 094	0,89
111-CH/BO/VD	1, 125	1, 125	1,29
073-CH/VG/VD	1, 094	0, 617	1,19
072-CH/BO/VD	1, 109	1, 109	1,23
031-CH/BO/VD	0, 944	0, 944	0,84
024-CH/BO/VD	1,125	1, 125	1,13

\*CIF ≤ 0,5 - sinérgica; CIF > 0,5 e ≤ 1,0 - aditiva; CIF 1,0 < CIF ≤ 4,0 – indiferente; CIF > 4,0 – antagonista.

## Discussão e Conclusões

O presente trabalho consistiu na síntese e estudo do perfil farmacológico de duas classes de compostos. A primeira consistiu em tiossemicarbazonas que pudessem agir como agentes quelantes para potencial uso na remoção de metais de cérebros de pacientes portadores de doenças neurodegenerativas. A segunda classe foi composta por complexos metálicos de tiossemicarbazonas, bis(fenilhidrazonas) e de clioquinol com potenciais aplicações como agentes citotóxicos frente a células tumorais e como agentes antimicrobianos.

As tiossemicarbazonas são caracterizadas pela presença da cadeia N-N-C(S)-N. São compostos amplamente investigados na Química Medicinal Inorgânica em função de suas capacidades quelantes, do papel da coordenação em mecanismos de ação e de suas propriedades farmacológicas<sup>1</sup>. A literatura tem mostrado que suas atividades biológicas dependem da natureza dos grupos ligados ao carbono azometínico. Tiossemicarbazonas sem a presença de um heteroátomo ou de grupos coordenantes no anel aromático unido ao carbono azometínico, representam um grupo de compostos que podem se ligar aos metais de forma bidentada. Por sua vez, tiossemicarbazonas  $\alpha$ (N)-heterocíclicas podem atuar como sistemas quelantes tridentados. Sabe-se que uma menor capacidade quelante resulta em diminuição dos efeitos farmacológicos das tiossemicarbazonas.<sup>2</sup>

No presente trabalho os dois grupos de tiossemicarbazonas foram investigados. Em uma primeira etapa foram preparadas tiossemicarbazonas contendo um sistema bidentado e o perfil farmacológico das mesmas foi avaliado. Uma menor capacidade quelante e a consequente redução dos efeitos farmacológicos das tiossemicarbazonas são interessantes quando se pretende usá-las como agentes complexantes para remoção de metais tóxicos. De fato, para esse tipo de aplicação os compostos não devem apresentar atividade citotóxica ou antimicrobiana, mas devem apenas coordenar-se aos metais e ser excretados sob a forma do complexo.

As seguintes tiossemicarbazonas com sistema bidentado foram preparadas: acetofenona-*N*(3)-*meta*-clorofenil-, *N*(3)-*meta*-flúorfenil-, *N*(3)-*meta*-nitrofenil-, *N*(3)-*orto*-toluil-, *N*(3)-*meta*-toluil- e *N*(3)-*para*-toluil- tiossemicarbazonas (HAc3mCl, HAc3mF, HAc3mNO<sub>2</sub>, HAc3oT, HAc3mT e HAc3pT); e benzofenona- *N*(3)-*meta*-clorofenil-, *N*(3)-*meta*-flúorfenil-, *N*(3)-*meta*-nitrofenil-, *N*(3)-*orto*-toluil-, *N*(3)-*meta*-toluil- e *N*(3)-*para*-toluil- tiossemicarbazonas (HBz3mCl, HBz3mF, HBz3mNO<sub>2</sub>, HBz3oT, HBz3mT e HBz3pT) sendo oito delas inéditas. Suas atividades antimicrobianas e citotóxicas foram avaliadas. As estruturas cristalográficas de HAc3mF, HAc3oT, HAc3mT e HBz3oT foram determinadas, nas quais se encontram na conformação *EE*.

Todas as tiossemicarbazonas derivadas de acetofenona e benzofenona não se mostraram ativas contra o crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e do fungo

<sup>1</sup> R.P. Tenório, A.J. S. Góes, J.G. Lima, A.R. Faria, A.J. Alves, T.M. Aquino, Quím. Nova. 28 (2005) 1030.

<sup>2</sup> H. Beraldo, Quim. Nova, 27 (2004) 461.

*Candida albicans*. Esses mesmos compostos também revelaram baixa atividade citotóxica frente às células leucêmicas (HL-60 e Jurkat), de tumores sólidos (K562 e MCF-7) e de glioblastomas (U87 e T98) humanos. Esses resultados foram um estímulo para investigar os efeitos tóxicos *in vivo* dessa família de tiossemicarbazonas. A capacidade quelante (devido à presença do sistema N-S) e a baixa toxidez frente a diferentes sistemas biológicos são propriedades interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes com Mal de Alzheimer. HAc3mT demonstrou os menores índices de atividade citotóxica. Portanto, HAc3mT foi o composto escolhido para o teste de toxicidade aguda *in vivo*. HAc3mT foi classificado como um composto de baixa toxicidade oral em dose única. Uma avaliação da biodisponibilidade oral e da capacidade em atravessar a barreira hemato-encefálica estão sendo realizados de modo a complementar esse teste. Valores calculados de  $\log P = 3,87 \pm 0,58$  sugerem uma lipofilia adequada para chegar ao cérebro.

Em uma segunda etapa foi avaliada a capacidade das tiossemicarbazonas de acetofenona e benzofenona *N*(3)-*meta*-substituídas em coordenar-se ao zinco(II) como uma possibilidade do uso desses ligantes como agentes quelantes para remoção de zinco(II) em cérebros de pacientes com doenças neuro-degenerativas. Todos os complexos de zinco(II) foram do tipo  $[M(L)_2]$ . Os dados cristalográficos de  $[Zn(Ac3mCl)_2]$  e  $[Zn(Bz3mF)_2]$  evidenciam a formação de moléculas neutras com um centro metálico de zinco(II) ligado a duas tiossemicarbazonas através do sistema N-S. Os compostos não foram ativos contra bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Uma vez que as tiossemicarbazonas revelaram-se praticamente inativas como agentes antimicrobianos e citotóxicos, e que seus complexos de zinco(II) também foram inativos como agentes antimicrobianos, essa família de tiossemicarbazonas poderiam constituir candidatos a protótipos de fármacos quelantes de zinco(II) – e também de cobre(II) – para o tratamento de doenças causadas pelo acúmulo de metais, como a doença de Alzheimer. De fato, quelantes para essa finalidade teriam que ser “ligantes inocentes”. A falta de atividade antimicrobiana dos complexos, nesse caso, seria uma qualidade positiva, já que evitaria o aparecimento de resistência.

Em outra parte do trabalho foram investigados os efeitos citotóxicos de complexos de ouro(I, III) e de platina(I,IV) de tiossemicarbazonas  $\alpha$ (N)-heterocíclicas. Essa classe de tiossemicarbazonas tem-se revelado como bons agentes citotóxicos e são conhecidas por inibir a atividade da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), envolvida na biosíntese do ADN<sup>2</sup>. As barreiras encontradas no uso clínico dos fármacos atuais, como a cisplatina, impulsionam a ampla investigação no desenvolvimento de novos compostos que superem a resistência celular e a toxidez dos metalofármacos de platina.

Enquanto que as tiossemicarbazonas  $\alpha$ (N)-heterocíclicas têm sua atividade citotóxica atribuída à inibição da atividade da RDR, o mecanismo de ação da cisplatina está relacionado com seus diferentes tipos de interação com o ADN. Por outro lado as atividades citotóxicas de complexos de ouro parecem estar vinculadas à alta afinidade pela enzima tiorredoxina redutase (TrxR), que catalisa

uma das etapas de biosíntese do ADN. No entanto, a literatura relata que complexos de outros metais, como platina(II), podem também inibir a ação da TrxR<sup>3</sup>. Portanto, estudos para verificar um possível sinergismo entre as ações citotóxicas de ligantes da classe das tiossemicarbazonas  $\alpha$ (N)-heterocíclicas e íons metálicos de ouro(I, III) e platina(II, IV) foram realizados.

As reações entre HAuCl<sub>4</sub> e 2-formilpiridina *N*(4)-*para*-toluil tiossemicarbazona (H2Fo4pT), 2-acetilpiridina *N*(4)-*orto*-toluil, *N*(4)-*meta*-toluil e *N*(4)-*para*-toluil tiossemicarbazona (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT), e 2-benzoilpiridina *N*(4)-*para*-toluil tiossemicarbazona (H2Bz4pT) levaram à formação de apenas um complexo de ouro(I), [Au(H<sub>py</sub>Fo4pT)Cl] e quatro complexos de ouro(III): [Au(2Ac4oT)Cl][AuCl<sub>2</sub>], [Au(H<sub>py</sub>2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>]Cl·H<sub>2</sub>O, [Au(H<sub>py</sub>2Ac4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl e [Au(H<sub>py</sub>2Bz4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl·2HCl. Em [Au(H<sub>py</sub>Fo4pT)Cl] e [Au(H<sub>py</sub>2Ac4mT)Cl<sub>2</sub>]Cl·H<sub>2</sub>O as tiossemicarbazonas neutras encontram-se coordenadas ao centro metálico apenas através do átomo de enxofre. No complexo [Au(2Ac4oT)Cl][AuCl<sub>2</sub>] a tiossemicarbazona em sua forma aniônica está coordenada ao ouro(III) pelo sistema N-N-S. Em [Au(H<sub>py</sub>2Ac4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl e [Au(H<sub>py</sub>2Bz4pT)Cl<sub>2</sub>]Cl·2HCl as tiossemicarbazonas estão coordenadas ao centro de ouro(III) através dos átomos de nitrogênio imínico e de enxofre.

As tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro(I, III) foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de células de glioblastomas humanos U-87 (que expressam a proteína pró-apoptótica p53) e T-98 (que expressam uma proteína p53 mutante). Em geral, os compostos exibiram alta atividade citotóxica contra as duas linhagens de células. Todas as tiossemicarbazonas foram mais ativas que a cisplatina e a auranofina usadas como controle. A coordenação ao metal melhorou o efeito citotóxico em dois casos contra as células U-87 e T-98. Todos os complexos de ouro foram mais ativos que o sal de partida e que a cisplatina contra as células U-87 e em apenas dois casos foram ligeiramente menos ativos que a auranofina. Todos os complexos foram mais ativos que o sal de ouro, a auranofina e a cisplatina contra o crescimento de células T-98, revelando uma maior sensibilidade dessas células em relação às células U-87. A citotoxicidade dos complexos de ouro(I, III) e suas tiossemicarbazonas também foi avaliada contra células saudáveis de fibroblastos de pulmão de feto humano (MRC-5). Em geral, os valores de índice terapêutico [IT = CI<sub>50</sub>(MRC-5)/CI<sub>50</sub>(célula tumoral)] para todos os compostos foram muito baixos, inclusive para os fármacos de referência. Características como o encolhimento celular, formas arredondadas e formação de vesículas foram observadas em micrografias das células U-87, T-98 e MRC-5, sugerindo a indução da morte celular por apoptose.

Também foram preparados complexos de platina(II, IV) de 2-acetilpiridina *N*(4)-*orto*-toluil-, *N*(4)-*meta*-toluil e *N*(4)-*para*-toluil tiossemicarbazona (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT). Nos complexos de platina(II) [Pt(H2Ac4oT)Cl<sub>2</sub>] e [Pt(2Ac4mT)(H<sub>2</sub>O)Cl] as tiossemicarbazonas

<sup>3</sup> K. Becker, C. Herold-Mende, J.J. Park, G. Lowe, R.H. Schirmer, J. Med. Chem. 44 (2001) 2784.

coordenam-se através dos átomos de nitrogênio imínico e de enxofre. A tiossemicarbazonas encontra-se neutra no complexo  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}_4\sigma\text{T})\text{Cl}_2]$  e em sua forma aniônica em  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$ . No complexo de platina(II)  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4p\text{T})\text{Cl}]$  e em todos os complexos de platina(IV) ( $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4\sigma\text{T})\text{Cl}_2(\text{OH})]$ ,  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4m\text{T})\text{Cl}_2(\text{OH})]$  e  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4p\text{T})\text{Cl}_2(\text{OH})]$ ) a tiossemicarbazona aniônica encontra-se coordenada ao centro metálico pelo sistema  $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$ . As estruturas cristalográficas de  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4\sigma\text{T})\text{Cl}]$  e  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4m\text{T})\text{Cl}]$  confirmam os modos de coordenação sugeridos e indicam a perda de uma molécula de HCl no primeiro caso e de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  no segundo.

Os complexos de platina(II, IV) e suas tiossemicarbazonas foram testados contra o crescimento de células leucêmicas (HL-60 e Jurkat) e de tumor mamário (MCF-7). O estudo da atividade citotóxica mostrou que a coordenação à platina(II, IV) não foi uma estratégia eficaz para aumentar a atividade dessas tiossemicarbazonas frente à linhagens de células MCF-7 e HL-60, visto que as tiossemicarbazonas foram mais ativas que seus complexos e, na maioria dos casos, mais ativas que a cisplatina. No entanto, um resultado interessante foi obtido no teste de atividade citotóxica frente a células leucêmicas Jurkat. Apesar de todos os compostos exibirem atividade inferior à da cisplatina, eles foram mais ativos que as tiossemicarbazonas livres, com exceção de  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4m\text{T})\text{Cl}_2(\text{OH})]$ , sugerindo a eficácia da coordenação para o aumento da citotoxicidade contra a linhagem de células Jurkat.

Os efeitos citotóxicos dos complexos de platina(II, IV) contra células de glioblastomas humanos U-87 e T-98 e células saudáveis MRC-5 também foram avaliados. Todos os complexos de platina(II, IV) mostraram-se bastante citotóxicos contra células MRC-5. Os complexos de platina(II, IV) foram menos ativos que seus análogos de ouro(I, III) contra as células U-87 e T-98. Todos os complexos de platina(II, IV) foram mais ativos que seus sais precursores contra as duas linhagens de células. De um modo geral, os complexos de platina(IV) foram mais ativos que seus análogos de platina(II). A coordenação a platina(II, IV) melhorou o efeito citotóxico de  $\text{H}_2\text{Ac}_4m\text{T}$  frente às células U-87 e T-98, sendo os complexos mais ativos que a cisplatina. Todos os complexos de platina(II, IV) exibiram maior atividade que a cisplatina contra as células T-98, com exceção de  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{Ac}_4\sigma\text{T})\text{Cl}_2]$  e  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4p\text{T})\text{Cl}]$ . As semelhanças entre os efeitos citotóxicos das tiossemicarbazonas livres, entre aquelas dos complexos de platina(II) e entre os dos complexos de platina(IV) contra as linhagens U-87 e T-98 sugerem que os mecanismos de ação desses compostos poderiam ser dependentes ou independentes da ação pró-apoptótica da proteína p53.

A capacidade em inibir a atividade da enzima TrxR foi avaliada para a tiossemicarbazona  $\text{H}_2\text{Ac}_4m\text{T}$ , seus complexos de ouro(III)  $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}\text{2Ac}_4m\text{T})\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , de platina(II)  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4m\text{T})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$  e de platina(IV)  $[\text{Pt}(\text{2Ac}_4m\text{T})\text{Cl}_2(\text{OH})]$ , e os sais de partida  $\text{HAuCl}_4$ ,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  e  $\text{K}_2\text{PtCl}_6$ , usando auranofina e cisplatina como controles. A tiossemicarbazona livre, seus complexos de platina(II, IV) e os sais de platina exibiram baixos índices de inibição da atividade da TrxR, enquanto que o complexo de ouro(III) inibiu cerca de 75 % da atividade enzimática a 10  $\mu\text{M}$ . O sal de ouro e a

auranofina inibiram cerca de 90 % da atividade enzimática na mesma concentração. Visto que todos os compostos exibiram valores de  $IC_{50}$  inferiores a 10  $\mu M$  (concentração empregada no teste) contra células T-98 e U-87, diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos nas atividades citotóxicas das tiossemicarbazonas livres, dos complexos de ouro(I, III) e de seus análogos de platina(II, IV) contra as células de glioblastomas .

Os mesmos compostos testados quanto ao seu efeito de inibição da atividade da TrxR foram avaliados quanto à interação com ADN plasmidial. A tiossemicarbazona  $H_2Ac_4mT$ , seu complexo de ouro(III)  $[Au(H_{py}2Ac_4mT)Cl_2]Cl \cdot H_2O$ , o sal  $HAuCl_4$  e a auranofina não interagiram com o ADN, enquanto que os sais  $K_2PtCl_4$ ,  $K_2PtCl_6$  interagiram fracamente. Os complexos de platina(II)  $[Pt(2Ac_4mT)(H_2O)Cl]$ , de platina(IV)  $[Pt(2Ac_4mT)Cl_2(OH)]$  e a cisplatina interagiram significativamente com o ADN, dificultando sua mobilidade eletroforética. Esses resultados comparados aos observados no teste de inibição da TrxR, sugerem que os modos de ação citotóxica dos complexos de platina podem ter como alvo principal o ADN, enquanto que os complexos de ouro agem majoritariamente pela inibição da enzima TrxR. Como é esperado, o não envolvimento da tiossemicarbazona tanto com a enzima TrxR quanto com o ADN está relacionado com a sua atuação citotóxica através da inibição da enzima RDR.

Outra classe de compostos amplamente investigados na literatura devido à sua alta capacidade quelante e diferentes propriedades farmacológicas são as hidrazonas. Nesta parte do trabalho foram preparados complexos de bismuto(III) e antimônio(III) de 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazonas). O interesse foi verificar se a coordenação a metais poderia melhorar o perfil farmacológico de 2,6-diacetilpiridina *bis*(fenilhidrazonas).

A reação de  $BiCl_3$  e  $SbCl_3$  com 2,6-diacetilpiridina de *bis*(fenilhidrazona) ( $H_2AcPh$ ), *bis*(*para*-clorofenilhidrazona) ( $H_2AcpClPh$ ) e *bis*(*para*-nitrofenilhidrazona) ( $H_2AcpNO_2Ph$ ) forneceu como produtos complexos em que a *bis*(fenilhidrazona) encontra-se monoaniônica e pentacoordenada através dos átomos de nitrogênio imínico e da piridina, e de oxigênio juntamente com dois cloretos completando a esfera de coordenação. As estruturas cristalográficas de  $[Sb(AcpClPh)Cl]$  e  $[Bi(AcpNO_2Ph)(DMSO)Cl]$  confirmam os modos de coordenação sugeridos e indicam a perda de uma molécula de HCl em ambos os casos.

A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. As *bis*(fenilhidrazonas) não foram ativas contra os microorganismos testados. A maioria dos compostos foram inativos contra *S. epidermidis*, com exceção dos complexos de bismuto(III) que mostraram-se menos ativos que a ciprofloxacina usada como referência.

A coordenação a bismuto(III) e antimônio(III) fez aumentar a ação antimicrobiana exceto para o complexo  $[Sb(HAcpCl)Cl_2]$  contra *C. albicans*. Os complexos de bismuto(III) foram mais ativos que seus análogos de antimônio(III). A coordenação ao bismuto(III) provocou uma melhora significativa

na atividade antimicrobiana contra o crescimento de todas as cepas de bactérias *gram*-positivas e, em menor escala, contra bactéria *gram*-negativa *P. aeruginosa*. Em geral, os complexos de bismuto(III) foram mais ativos que a tetraciclina contra *S. aureus* e demonstraram uma ordem de atividade:  $[\text{Bi}(\text{HAcPh})\text{Cl}_2] < [\text{Bi}(\text{HAc}p\text{ClPh})\text{Cl}_2] < [\text{Bi}(\text{HAc}p\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$  sugerindo que a presença de grupos elétron-retiradores no ligante poderia contribuir para um aumento da ação contra *S. aureus*. Nos complexos de antimônio(III), a substituição no anel aromático por um cloreto foi uma boa estratégia para melhorar a atividade contra *S. aureus* e *E. faecalis*. No entanto um efeito contrário pode ser observado para o complexo que contém o grupo nitro  $[\text{Sb}(\text{HAc}p\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ . Apenas o complexo  $[\text{Bi}(\text{HAc}p\text{ClPh})\text{Cl}_2]$  foi mais ativo que o fluconazol, composto usado como referência contra *C. albicans*.

Foi avaliada a atividade dos compostos de antimônio(III) e das *bis*(fenilhidrazonas) contra *Leishmania (L.) amazonensis*. De fato, o tratamento de leishmanioses na clínica é baseado em compostos de antimônio<sup>4</sup>. Apesar de a coordenação não ter promovido um aumento na atividade desses compostos, a avaliação da atividade anti-*leishmania* para *bis*(fenilhidrazonas) é inédita e mostrou um resultado interessante para  $\text{H}_2\text{AcPh}$ , que inibiu cerca de 80% do crescimento das células.

As *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III) e antimônio(III) também foram testados contra o crescimento de células Jurkat, HL-60, MCF-7, HCT-116 (carcinoma colo retal) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*).

Em geral, as *bis*(fenilhidrazonas) foram pouco ativas contra as linhagens celulares testadas. A maior atividade citotóxica exibida para  $\text{H}_2\text{AcPh}$  contra MCF-7 indica, de um modo geral, que grupos *p*-clorofenil e *p*-nitrofenil provocam uma diminuição na citotoxicidade em comparação com o derivado não-substituído. Após a coordenação ao antimônio(III), com exceção de  $[\text{Sb}(\text{HAc}p\text{NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ , a citotoxicidade aumentou significativamente contra as linhagens de células MCF-7 e HL60, sendo que os complexos de antimônio(III) demonstraram atividade superior à da cisplatina. A coordenação ao bismuto(III) foi uma boa estratégia para aumentar a atividade citotóxica das *bis*(fenilhidrazonas) contra todas as linhagens de células testadas. Os complexos de bismuto(III) foram mais ativos que seus análogos de antimônio(III) e, em geral, mais ativos que a cisplatina. Apesar de não ter sido possível avaliar a atividade citotóxica do cloreto de bismuto(III) devido à sua baixa solubilidade, comparações com o cloreto de antimônio(III) poderiam indicar que a atividade dos complexos de bismuto(III) está associada ao complexo e não apenas à presença do metal. Em geral, os valores de  $\text{CI}_{50}$  em células PBMC foram maiores do que os valores de  $\text{CI}_{50}$  em células tumorais, ou seja, os compostos são ativos em concentrações inferiores àsquelas que provocam um efeito tóxico.

A coordenação de *bis*(fenilhidrazonas) ao bismuto(III) foi mais eficaz para a obtenção de novos candidatos a fármacos antitumorais do que a coordenação ao antimônio(III). Diante disso, foi

---

<sup>4</sup> P. Baiocco, G. Colotti, S. Franceschini, A. Ilari, J. Med. Chem. 52 (2009) 2603.

realizada uma investigação do potencial pró-apoptótico em células Jurkat, HL-60, MCF-7 e HCT-116 das *bis*(fenilhidrazonas) e seus complexos de bismuto(III). A maioria dos complexos induziu uma maior porcentagem de fragmentação do ADN nas células testadas que os ligantes. A indução de fragmentação do ADN pelas hidrazonas e seus complexos de bismuto(III) indica que a morte por apoptose é um dos modos de ação citotóxica desses compostos contra as linhagens celulares investigadas.

Portanto, a coordenação a bismuto(III) e antimônio(III), de *bis*(fenilhidrazonas) que revelaram-se fracamente bioativas, foi uma estratégia eficaz para melhorar o perfil farmacológico dessa classe de compostos. Os complexos podem agir aumentando a biodisponibilidade dos metais devido ao caráter lipofílico dos ligantes, ou através da liberação lenta do metal para o alvo biológico.

Complexos organoestânicos e de platina(II, IV) foram obtidos com 5-cloro-7-iodohidroquinolina (HQI), o clioquinol. O clioquinol é um antifúngico que apresenta propriedades quelantes e tem demonstrado atividade contra a proliferação de células tumorais.<sup>5</sup>

Uma vez que clioquinol e compostos de estanho(IV) mostram atividade antimicrobiana, no presente trabalho foram então obtidos complexos organoestânicos com clioquinol e suas atividades contra cepas de fungos e bactérias foram avaliadas. Foram obtidos os complexos  $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}$  e  $[\text{SnPh}(\text{QI})\text{Cl}_2]$ , nos quais o clioquinol encontra-se desprotonado e coordenado ao centro de estanho através dos átomos de oxigênio e nitrogênio.

A atividade antimicrobiana dos complexos organoestânicos foi avaliada primeiramente contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. A coordenação do clioquinol a diferentes sais organoestânicos ( $[(n\text{-Bu})\text{SnCl}_3]$  e  $\text{SnPhCl}_3$ ) provocou um aumento na atividade antifúngica, mas não contribuiu para melhorar a atividade antibacteriana. O clioquinol já é um composto antifúngico, porém com a coordenação a atividade aumentou em torno de dez vezes. Os complexos foram aproximadamente cem vezes mais ativos que o fluconazol, fármaco usado como controle. Como os sais de partida também exibiram atividade muito inferior à dos complexos, pode-se sugerir que essa atividade é intrínseca dos complexos. Assim, a coordenação ao *n*-butilestanho(IV) e a fenilestanho(IV) seria uma boa estratégia para aumentar a atividade antifúngica dessa classe de compostos.

Como os complexos organoestânicos de clioquinol mostraram-se muito eficazes contra *C. albicans* a ação antifúngica do clioquinol e dos complexos de estanho(IV) foi avaliada contra quatro espécies de *Candida spp.* (*C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*). O complexo  $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}$  foi mais ativo que o clioquinol e o fluconazol frente a todas as espécies de *Candida* enquanto que o seu sal de partida não exibiu atividade. O complexo  $[\text{SnPh}(\text{QI})\text{Cl}_2]$  foi mais ativo que o clioquinol contra *C. parapsilosis* mas demonstrou atividade semelhante à do clioquinol nos outros casos.  $[\text{SnPh}(\text{QI})\text{Cl}_2]$  mostrou-se mais ativo que o fluconazol contra cepas de *C.*

<sup>5</sup> A.Y. Shaw, C.Yi Chang, M.Y. Hsu, P.J. Lu, C.N. Yang, H.L. Chen, C.W. Lo, C.W. Shiau, M.K. Chern, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2860.

*krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e mostrou uma atividade semelhante à do fluconazol contra *C. albicans*. O sal de partida  $[\text{SnPhCl}_3]$  revelou baixa atividade antifúngica contra todas as cepas testadas. Dessa forma, a coordenação do clioquinol ao estanho(IV) revelou-se como uma interessante ferramenta para melhorar a atividade do clioquinol contra espécies de *Candida spp.* Em geral, estes dados são muito interessantes, pois as espécies *Candida* não-*albicans*, especialmente aquelas incluídas neste estudo, são consideradas problemáticas em termos da terapia antifúngica.<sup>6</sup>

Espécies de *Candida* são fungos que fazem parte da microbiota humana normal. No entanto, pode desencadear diversas doenças por infecções em indivíduos normais e, principalmente, em situações de baixa imunidade. Os desafios nos tratamentos que surgem em grande parte devido às resistências aos medicamentos contribuem para os estudos contínuos nessa área<sup>7</sup>. O emprego da terapia de combinação surgiu para superar essas dificuldades. Assim, o estudo do efeito da combinação dos complexos de estanho(IV) com o fluconazol foi desenvolvido. Foram avaliadas as seguintes combinações: clioquinol/fluconazol,  $[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}$ ·fluconazol e  $[\text{SnPh}(\text{QI})\text{Cl}_2]$ ·fluconazol frente a doze cepas de *C. albicans*.

$[(n\text{-Bu})\text{Sn}(\text{QI})_2]\text{Cl}$ /fluconazol foi mais potente que clioquinol/fluconazol contra seis cepas, enquanto que a combinação  $[\text{SnPh}(\text{QI})\text{Cl}_2]$ /fluconazol foi mais ativa que clioquinol/fluconazol contra cinco cepas. Em muitos casos, o efeito passou de indiferente em clioquinol/fluconazol para aditivo nas combinações dos complexos com o fluconazol. Embora as médias dos valores de concentração inibitória fracionária (CIF) possam ser consideradas como indicativas de um efeito aditivo, diferenças intrínsecas das cepas resultaram em perfis de susceptibilidade distintos para as combinações testadas. Portanto, a investigação da ação antifúngica dos complexos de estanho(IV) com clioquinol demonstrou propriedades interessantes para essa classe de compostos.

Como mencionamos, clioquinol apresenta efeito citotóxico contra células tumorais. Desse modo pareceu-nos interessante preparar complexos de clioquinol com platina(II) e platina(IV), os quais reuniriam propriedades citotóxicas do ligante às dos metais. Foram então preparados o complexo de platina(II)  $[\text{Pt}(\text{QI})_2]\cdot 2\text{KCl}$  e o de platina (IV)  $[\text{Pt}(\text{QI})_2\text{Cl}_2]\cdot \text{KCl}$  com clioquinol. Os complexos são neutros e contém duas moléculas aniônicas de clioquinol coordenadas através dos átomos de oxigênio e nitrogênio. A estrutura obtida a partir do complexo de platina(II) confirma os modos de coordenação sugeridos. Os dados cristalográficos apontam para uma molécula neutra formada por um centro metálico de platina(II) coordenado por um ligante cloreto, uma molécula de DMSO (solvente usado para cristalização) e um clioquinol desprotonado, ligado ao metal através dos átomos de nitrogênio e oxigênio.

<sup>6</sup> G. Morace, E. Borghi, R. Iatta, G. Amato, S. Andreoni, G. Brigante, C. Farina, G.L. Cascio, G. Lombardi, E. Manso, M. Mussap, P. Pecile, R. Rigoli, E. Tangorra, M. Valmarin, M.T. Montagna. BMC Infect. Dis. 11 (2011) 130.

<sup>7</sup> J.W.M. van der Meer, F. van de Veerdonk, L.A.B. Joosten, B-J. Kullberg, M.G. Netea. Int. J. Antimicrob. Ag. 36S (2010) S58.

A atividade citotóxica do clioquinol, de seus complexos de platina(II, IV) e os sais de partida foi avaliada frente a células Jurkat, HL-60, MCF-7, e HCT-116. Todos os compostos demonstraram baixa atividade contra as células Jurkat, MCF-7 e HCT-116 a 10  $\mu$ M. No entanto, os complexos foram cerca de duas vezes mais ativos que o clioquinol e ligeiramente mais ativos que a cisplatina contra células HL-60. Dessa forma, a coordenação a platina(II, IV) foi eficaz para melhorar a citotoxicidade contra as linhagens de células HL-60.

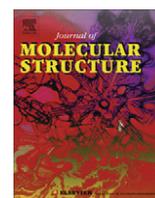
A descoberta de uma tiossemicarbazona que tem afinidade por zinco(II) –e certamente também por cobre(II)- sem contudo apresentar atividade citotóxica ou antimicrobiana, e que mostrou não apresentar toxidez aguda *in vivo* nos leva a considerá-la para estudos posteriores de toxidez e de capacidade de impedir a agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide.

Estudos de interações entre os compostos com ação citotóxica contra células tumorais humanas e possíveis alvos biológicos como o ADN e enzimas contribuíram para o início das investigações sobre seus mecanismos de ação.

A estratégia da coordenação aos metais mostrou-se eficaz em muitos casos para melhorar o perfil farmacológico das tiossemicarbazonas, *bis*(hidrazonas) e do clioquinol, as três classes de compostos que foram investigados quanto às atividade citotóxica e antimicrobiana.

O presente trabalho constitui importante contribuição em que novos candidatos a protótipos de fármacos foram estudados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, para o tratamento de tumores e de infecções microbianas.

## **ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS**



## Structural studies on acetophenone- and benzophenone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) complexes

Karina S.O. Ferraz<sup>a</sup>, Nayane F. Silva<sup>a</sup>, Jeferson G. Da Silva<sup>a</sup>, Nivaldo L. Speziali<sup>b</sup>, Isolda C. Mendes<sup>c</sup>, Heloisa Beraldo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Escola de Belas Artes, Departamento de Artes Plásticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 September 2011

Received in revised form 21 November 2011

Accepted 21 November 2011

Available online 28 November 2011

#### Keywords:

Thiosemicarbazones

Zinc(II) complexes

Crystal structures

### ABSTRACT

In the present work *N*(3)-*meta*-chlorophenyl- (HAc3mCl, **1**) and *N*(3)-*meta*-fluorophenyl- (HAc3mF, **2**) acetophenone thiosemicarbazone, and *N*(3)-*meta*-chlorophenyl- (HBz3mCl, **3**) and *N*(3)-*meta*-fluorophenyl- (HBz3mF, **4**) benzophenone thiosemicarbazone were obtained, as well as their zinc(II) complexes [Zn(Ac3mCl)<sub>2</sub>] (**5**), [Zn(Ac3mF)<sub>2</sub>] (**6**), [Zn(Bz3mCl)<sub>2</sub>] (**7**) and [Zn(Bz3mF)<sub>2</sub>] (**8**). Upon re-crystallization in DMSO:acetone conversion of **8** into [Zn(Bz3mF)<sub>2</sub>](DMSO) (**8a**) occurred. The crystal structures of **2**, **5** and **8a** were determined.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Thiosemicarbazones are an important class of compounds with innumerable biological applications as antitumor, antiviral and antimicrobial agents [1].  $\alpha$ (*N*)-heterocyclic thiosemicarbazones were extensively investigated for their antitumor and cytotoxic activities, which were related to their ability to inhibit ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), a key enzyme involved in DNA synthesis [2].

Thiosemicarbazones act as ligands in coordination chemistry in different ways [3]. They can bind metal ions as bidentate NS- or tridentate NNS-donor ligands forming five-membered chelate rings. Transition metal complexes of thiosemicarbazones are of considerable interest in chemistry because of their bioinorganic relevance [4,5].

Zinc is the second most prominent trace metal in the human body after iron. Zinc(II) ions are essential for all forms of life. In humans, they have catalytic and structural functions in an estimated 3000 zinc proteins [6]. Zinc is cytoprotective and suppresses apoptotic pathways. Zinc plays a role in brain, where it has a specific function as a neuromodulator in addition to its other typical cellular functions [7].

Considering the wide pharmacological versatility of thiosemicarbazones and the important role of zinc(II) in biological processes, it is of interest to prepare new zinc(II) complexes with

thiosemicarbazones. In fact zinc(II) complexes with this class of ligands proved to exhibit cytotoxic, antiproliferative [3,8] and antimicrobial activities [9], among others.

In the present work *N*(3)-*meta*-chlorophenyl acetophenone-(HAc3mCl) and *N*(3)-*meta*-fluorophenyl acetophenone-(HAc3mF) thiosemicarbazones and *N*(3)-*meta*-chlorophenyl benzophenone-(HBz3mCl) and *N*(3)-*meta*-fluorophenyl benzophenone-(HBz3mF) thiosemicarbazones (see Fig. 1) were obtained as well as their zinc(II) complexes. The spectral and structural properties of the studied compounds were investigated.

### 2. Experimental section

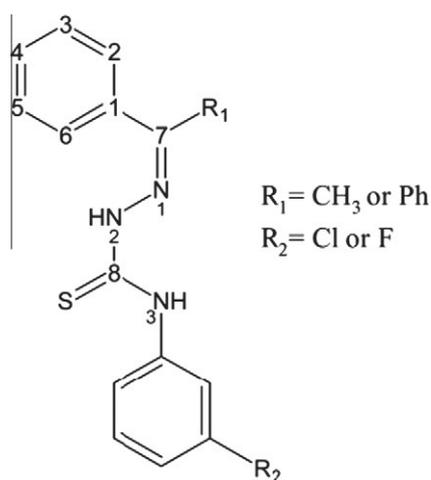
#### 2.1. Materials and measurements

Chemicals: acetophenone (Aldrich), benzophenone (Fluka), hydrazine hydrate (Aldrich), sulfuric acid (Synth), triethylamine (Merck), zinc(II) chloride (Vetec). Solvents: absolute ethanol (Synth), methanol (Synth), acetone (Synth), dimethylsulfoxide (Synth), DMSO-*d*<sub>6</sub> (CIL) and diethylether (Synth).

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using CsI pellets; an YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker DRX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*<sub>6</sub>) as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference.

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34095740; fax: +55 31 34095700.

E-mail address: [hberaldo@ufmg.br](mailto:hberaldo@ufmg.br) (H. Beraldo).



**Fig. 1.** General structure of *N*(3)-phenyl-acetophenone- and benzophenone-derived thiosemicarbazones.

The X-ray diffraction measurements were carried out on a GEMINI-Ultra diffractometer. The data collection, cell refinement results, and data reduction were performed using the CRYSLISPRO software [10]. Semi-empirical from equivalents absorption correction method was applied [10]. The structures were solved by direct methods using SHELXS-97 [11]. Full-matrix least-squares refinement procedure on  $F^2$  with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-97 [11]. 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.

## 2.2. Syntheses

### 2.2.1. Synthesis of *N*(3)-meta-chlorophenyl- (*HAc3mCl*, **1**) and *N*(3)-meta-fluorophenyl- (*HAc3mF*, **2**) acetophenone thiosemicarbazone, and *N*(3)-meta-chlorophenyl- (*HBz3mCl*, **3**) and *N*(3)-meta-fluorophenyl- (*HBz3mF*, **4**) benzophenone thiosemicarbazone

The thiosemicarbazones were prepared by a method described in the literature [12]. A solution of hydrazine hydrate (10 mmol) in methanol (10 mL) was added to a solution of the desired isothiocyanate (10 mmol in 10 mL of methanol). The reaction mixture was kept under stirring in an ice bath for 15 min. Thereafter, the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The obtained thiosemicarbazide was filtered and washed with diethyl ether. The thiosemicarbazide (5 mmol) was then dissolved in methanol (10 mL) and mixed to a solution of acetophenone or benzophenone (5 mmol) in methanol (10 mL) with addition of two drops of concentrated sulfuric acid. The reaction mixture was kept under stirring for 24 h at room temperature. The resulting solids were filtered off, washed with methanol and ether and dried in vacuum.

**2.2.1.1. *N*(3)-meta-chlorophenyl-acetophenone-thiosemicarbazone, *HAc3mCl* (**1**).** White solid. Yield: 68%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N3-H})$  3295 s,  $\nu(\text{N2-H})$  3239 m,  $\nu(\text{C=N})$  1520 s,  $\nu(\text{C=S})$  793 w. UV-Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 32362. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.04–7.99 (1H, d, H(2), H(6)); 7.44–7.39 (1H, t, H(3), H(4), H(5)); 7.79 (1H, s, H(10)); 7.28–7.24 (1H, d, H(12)); 7.43–7.39 (1H, t, H(13)); 7.61–7.57 (1H, d, H(14)); 10.77 (1H, s, N(2)H); 10.12 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 176.83, C8=S; 132.08, C7=N; 149.51, C1; 126.85, (C2, C6); 128.19, (C3, C5 and C4); 140.58, C9; 125.11, C10; 124.92, C12; 14.49, C15.  $^J(\text{H1})$ : 6.01,  $^1J(\text{H2, H3})$ ; 3.26,  $^1J(\text{H6, H5})$ ; 3.26,  $^2J(\text{H2, H4})$ ; 8.07,  $^1J(\text{H12, H13})$ ; 8.07,  $^1J(\text{H13, H14})$ .

**2.2.1.2. *N*(3)-meta-fluorophenyl-acetophenone-thiosemicarbazone, *HAc3mF* (**2**).** White solid. Yield: 99%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N3-H})$  3299 s,  $\nu(\text{N2-H})$  3264 s,  $\nu(\text{C=N})$  1520 s,  $\nu(\text{C=S})$  787 w. UV-Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 32,573. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.03–7.98 (1H, d, H(2), H(6)); 7.44–7.33 (1H, t, H(3), H(5) and H(4)); 7.67–7.61 (1H, s, H(10)); 7.04 (1H, d, H(12)); 7.44–7.33 (1H, t, H(13)); 7.48–7.33 (1H, d, H(14)); 2.39 (3H, s, H(15)); 10.50 (1H, s, N(2)H); 9.01 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 176.71, C8=S; 137.31, C7=N; 149.49, C1; 126.83, (C2, C6); 128.19, (C3, C5); 129.32, C4; 140.90–140.68, C9; 112.35–111.86, C10; 111.86–111.46, C12; 14.48, C15.  $^J(\text{H1})$ : 6.17,  $^1J(\text{H2, H3})$ ; 2.73,  $^2J(\text{H2, H4})$ ; 11.15,  $^1J(\text{H12, H13})$ ; 2.23  $^2J(\text{H12, H14})$ .

**2.2.1.3. *N*(3)-meta-chlorophenyl-benzophenone-thiosemicarbazone, *HBz3mCl* (**3**).** White solid. Yield: 70%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N3-H})$  3342 s,  $\nu(\text{N2-H})$  3292 s,  $\nu(\text{C=N})$  1588 s,  $\nu(\text{C=S})$  804 w. UV-Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 31,348. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.74–7.65 (1H, d, H(2), H(6)); 7.45–7.37 (1H, t, H(3), H(5) and H(4)); 7.74–7.65 (1H, s, H(10)); 7.31–7.27 (1H, d, H(12)); 7.45–7.37 (1H, t, H(13)); 7.60–7.56 (1H, d, H(14)); 10.50 (1H, s, N(2)H); 9.01 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 176.01, C8=S; 136.14, C7=N; 150.39, C1; 128.37, (C2, C6); 129.73, (C3, C5); 129.99, C4; 140.31, C9; 127.89, C10; 125.34, C12.  $^J(\text{H1})$ : 7.29,  $^1J(\text{H12, H13})$ ; 7.92,  $^1J(\text{H13, H14})$ .

**2.2.1.4. *N*(3)-meta-fluorophenyl-benzophenone-thiosemicarbazone, *HBz3mF* (**4**).** White solid. Yield: 88%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N3-H})$  3302 s,  $\nu(\text{N2-H})$  3198 s,  $\nu(\text{C=N})$  1546 s,  $\nu(\text{C=S})$  780 w. UV-Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 31,446. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.75–7.71 (1H, d, H(2), H(6)); 7.43–7.39 (1H, t, H(3), H(5) and H(4)); 7.58 (1H, s, H(10)); 7.07 (1H, d, H(12)); 7.68–7.65 (1H, t, H(13)); 7.68–7.65 (1H, d, H(14)); 10.52 (1H, s, N(2)H); 9.03 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 175.93, C8=S; 150.32, C7=N; C1; 127.62, (C2, C6); 128.37, (C3, C5); 129.97, C4; 140.65–140.43, C9; 112.69–112.34, C10; 112.20–111.93, C12.  $^J(\text{H1})$ : 6.08,  $^1J(\text{H12, H13})$ ; 2.53,  $^1J(\text{H13, H14})$ .

### 2.2.2. Synthesis of the zinc(II) complexes with *N*(3)-meta-chlorophenyl and *N*(3)-meta-fluorophenyl acetophenone- and benzophenone-thiosemicarbazones

The zinc(II) complexes were obtained by refluxing an ethanol solution of the desired thiosemicarbazone with zinc(II) chloride and triethylamine in 1:1:1 ligand-to-metal-to-triethylamine molar ratio. The obtained solids were washed with ethanol and diethyl ether and then dried under vacuum.

**2.2.2.1. Bis[*N*(3)-meta-chlorophenylacetophenone-thiosemicarbazonato]zinc(II), [*Zn*(*Ac3mCl*)<sub>2</sub>] (**5**).** Yellow solid. Yield: 74%. Anal. Calc. (MW 671.0) C, 53.70%; H, 3.91%; N, 12.52%. Found: C, 53.87%; H, 3.80%; N, 12.72.57%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  DMF):  $0.44 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ . IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N3-H})$  3414 m,  $\nu(\text{C=N})$  1490 s,  $\nu(\text{C=S})$  762 w,  $\nu(\text{Zn-N})$  423 m,  $\nu(\text{Zn-S})$  367 m. UV-Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 33,783, 30,769. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.57–7.53 (1H, d, H(2), H(6)); 7.34–7.14 (1H, t, H(3), H(5) and H(4)); 7.87 (1H, s, H(10)); 6.99–6.95 (1H, d, H(12)); 7.34–7.14 (1H, t, H(13)); 7.53–7.44 (1H, d, H(14)); 9.42 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 167.05, C8=S; 132.61, C7=N; 137.30, C1; 127.34, (C2, C6); 128.16, (C3, C5); 142.33, C9; 120.81, C10; 119.36, C12; 21.18, C15.  $^J(\text{H1})$ : 7.25,  $^1J(\text{H2, H3})$ ; 7.57,  $^1J(\text{H12, H13})$ ; 8.31,  $^1J(\text{H13, H14})$ .

**2.2.2.2. bis[*N*(3)-meta-fluorophenylacetophenone-thiosemicarbazonato]zinc(II), [*Zn*(*Ac3mF*)<sub>2</sub>] (**6**).** Yellow solid. Yield: 73%. Anal. Calc. (MW 638.09) C, 56.47%; H, 4.11%; N, 13.17%. Found: C, 56.44%; H, 4.00%; N, 13.27%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  DMF):  $0.18 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ . IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N3-H})$  3330 m,  $\nu(\text{C=N})$

1500 s,  $\nu(\text{C}=\text{S})$  756 w,  $\nu(\text{Zn}-\text{N})$  418 m,  $\nu(\text{Zn}-\text{S})$  349 m. UV–Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 31,152, 29,940. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.65–7.53 (1H, d, H(2), H(6)); 7.33–7.19 (1H, t, H(3), H(5) and H(4)); 7.65 (1H, s, H(10)); 6.74 (1H, d, H(12)); 7.33–7.19 (1H, t, H(13)); 7.33–7.19 (1H, d, H(14)); 9.43 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 167.11, C8=S; 137.30, C7=N; 159.64, C1; 127.34, (C2, C6); 128.19, (C3, C5); 142.82–142.59, C9; 106.75–106.22, C10; 107.85–107.76, C12.  $^J(^1\text{H})$ : 8.04,  $^J(\text{H}12, \text{H}13)$ .

2.2.2.3. *Bis[(N(3)-meta-chlorophenylbenzophenone-thiosemicarbazonato)zinc(II)], [Zn(Bz3mCl)2] (7)*. Yellow solid. Yield: 70%. Anal. Calc. (MW 795.13) C, 60.42%; H, 3.81%; N, 10.54%. Found: C, 60.14%; H, 3.80%; N, 10.57%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$  DMF):  $0.09 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ . IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N}3-\text{H})$  3320 m,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  1481 s,  $\nu(\text{C}=\text{S})$  777 w,  $\nu(\text{Zn}-\text{N})$  420 m,  $\nu(\text{Zn}-\text{S})$  349 m. UV–Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 31,250, 27,778. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.81 (1H, d, H(2), H(6)); 6.99–6.92 (1H, t, H(3), H(5)); 6.82 (1H, d, H(12)); 7.50–7.45 (1H, t, H(13)); 7.24 (1H, d, H(14)); 9.42 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 168.06, C8=S; 132.63, C7=N; 136.67, C1; 129.27, (C2, C6); 129.49 (C3, C5); 141.94, C9; 120.94, C10; 117.64, C12.  $^J(^1\text{H})$ : 8.03,  $^J(\text{H}12, \text{H}13)$ ; 8.42,  $^J(\text{H}13, \text{H}14)$ .

2.2.2.4. *Bis[(N(3)-meta-fluorophenylbenzophenone-thiosemicarbazonato)zinc(II)], [Zn(Bz3mF)2] (8)*. Yellow solid. Yield: 74%. Anal. Calc. (MW 762.23) C, 63.03%; H, 3.97%; N, 11.03%. Found: C, 62.83%; H, 3.76%; N, 11.28%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$  DMF):  $0.35 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ . IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{N}3-\text{H})$  3318 m,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  1481 s,  $\nu(\text{C}=\text{S})$  755 w,  $\nu(\text{Zn}-\text{N})$  419 m,  $\nu(\text{Zn}-\text{S})$  349 m. UV–Vis (DMF,  $\text{cm}^{-1}$ ): 29,851, 27,322. The main signals in  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.50–7.47 (1H, d, H(2), H(6)); 7.40–7.36 (1H, t, H(3), H(5)); 6.58 (1H, d, H(12)); 7.07 (1H, t, H(13)); 6.99–6.96 (1H, d, H(14)); 9.44 (1H, s, N(3)H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 167.90, C8=S; 136.90, C7=N; 159.50, C1; 128.31, (C2, C6); 129.45 (C3, C5); 142.36–142.13, C9; 105.94–105.91, C10;

107.77–107.34, C12.  $^J(^1\text{H})$ : 6.69,  $^J(\text{H}2, \text{H}3)$ ; 7.96,  $^J(\text{H}12, \text{H}13)$ ; 12.49,  $^J(\text{H}13, \text{H}14)$ .

### 2.3. X-ray crystallography

Upon slow evaporation of **2**, **5** and **8** in 9:1 acetone/DMSO crystals of HAc3mF (**2**), [Zn(Ac3mCl) $_2$ ] (**5**), and [Zn(Bz3mF) $_2$ ].DMSO (**8a**) were formed and their crystal structures were determined using single-crystal X-ray diffractometry.

A summary of the crystals data, data collection details and refinement results are listed in Table 1. Molecular graphics and packing figures were prepared using ORTEP [13] and PLATON [14], respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Formation of the thiosemicarbazones and zinc(II) complexes

Formation of the thiosemicarbazones was confirmed by their IR, electronic and NMR spectra. Microanalyses and molar conductivity data indicated the formation of [Zn(Ac3mCl) $_2$ ] (**5**), [Zn(Ac3mF) $_2$ ] (**6**), [Zn(Bz3mCl) $_2$ ] (**7**), and [Zn(Bz3mF) $_2$ ] (**8**) in which two anionic thiosemicarbazones are attached to the zinc(II) center.

### 3.2. Characterization

#### 3.2.1. IR spectra

In the infrared spectra of the thiosemicarbazones absorptions at 3342–3295  $\text{cm}^{-1}$  were assigned to the  $\nu(\text{N}-\text{H})$  stretching vibrations [15]. The absence of the absorption attributed to  $\nu(\text{N}2-\text{H})$  in the spectra of the complexes is according to coordination of an anionic thiosemicarbazone [16,4]. The band assigned to  $\nu(\text{C}=\text{N})$  at 1588–1520  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the thiosemicarbazones shifts to 1500–1481  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of complexes (**5–8**) suggesting coordination of the imine nitrogen [17]. The absorption attributed to  $\nu(\text{C}=\text{S})$  at 804–780  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the free

**Table 1**  
Crystal data and refinement results for HAc3mF (**2**), [Zn(Ac3mCl) $_2$ ] (**5**) and [Zn(Bz3mF) $_2$ ].DMSO (**8a**).

Identification code	(2)	(5)	(8a)
Empirical formula	C $_{16}$ H $_{16}$ FN $_3$ S	C $_{30}$ H $_{26}$ Cl $_2$ N $_6$ S $_2$ Zn	C $_{42}$ H $_{36}$ F $_2$ N $_6$ OS $_3$ Zn
Formula weight (g mol $^{-1}$ )	301.38	670.96	840.32
Crystal system	Triclinic	Monoclinic	Triclinic
Space group	<i>P</i> – 1	<i>C</i> 2/ <i>c</i>	<i>P</i> – 1
Temperature (K)	293(2)	293(2)	250(2)
Radiation, $\lambda$ (Å)	Mo K $\alpha$ , 0.71073	Cu K $\alpha$ , 1.54184	Mo K $\alpha$ , 0.71073
$\theta$ Range for data collection	3.00–26.37	4.71–58.93	4.08–26.37
Limiting indices	$-6 \leq h \leq 7$ , $-10 \leq k \leq 13$ , $-14 \leq l \leq 13$	$-21 \leq h \leq 21$ , $-9 \leq k \leq 10$ , $-19 \leq l \leq 14$	$-13 \leq h \leq 13$ , $-14 \leq k \leq 14$ , $-22 \leq l \leq 22$
<i>a</i> (Å)	5.8624(2)	19.3896(16)	10.4751(2)
<i>b</i> (Å)	10.5083(4)	9.0743(5)	11.4047(2)
<i>c</i> (Å)	12.0065(4)	17.4434(14)	18.3352(4)
$\alpha$ (°)	74.714(3)	90	79.654(2)
$\beta$ (°)	86.591(3)	104.534	75.821(2)
$\gamma$ (°)	89.559(3)	90	71.934(2)
Volume (Å $^3$ )	712.19(4)	2970.9(4)	2006.19(7)
<i>F</i> (000)	316	1376	868
<i>Z</i> / <i>D</i> calc. (mg m $^{-3}$ )	2/1.405	4/1.500	2/1.391
Absorption coefficient $\mu$ (mm $^{-1}$ )	0.235	4.371	0.819
Reflections collected	5414	9168	32790
Reflections unique/ <i>R</i> (int)	2901/0.0218	2132/0.0467	8170/0.0305
Completeness to $\theta$	99.9% ( $\theta = 26.37$ )	100.0% ( $\theta = 58.93$ )	99.6% ( $\theta = 26.37$ )
Data/restraints/parameters	2901/0/181	2132/0/187	8170/168/588
Final <i>R</i> indices [ <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )]	<i>R</i> $_1$ = 0.0430, <i>wR</i> $_2$ = 0.1071	<i>R</i> $_1$ = 0.0416, <i>wR</i> $_2$ = 0.1024	<i>R</i> $_1$ = 0.0324, <i>wR</i> $_2$ = 0.0839
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> $_1$ = 0.0694, <i>wR</i> $_2$ = 0.1147	<i>R</i> $_1$ = 0.0646, <i>wR</i> $_2$ = 0.1180	<i>R</i> $_1$ = 0.0458, <i>wR</i> $_2$ = 0.0871
Goodness-of-fit on <i>F</i> $^2$	0.953	1.051	1.039
Largest difference in peak and hole (e Å $^{-3}$ )	0.368 and –0.263	0.252 and –0.273	0.733 and –0.433

thiosemicarbazones shifts to 777–755  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the complexes, indicating coordination through a thiolate sulfur [9,18,19]. New absorptions at 423–418  $\text{cm}^{-1}$  and 367–349  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the complexes were assigned to  $\nu(\text{Zn}-\text{N})$  and  $\nu(\text{Zn}-\text{S})$ , respectively [4,20,21]. Hence the infrared spectra indicate coordination through the N–S chelating system.

### 3.2.2. Electronic spectra

The electronic spectra of the acetophenone-derived thiosemicarbazones show an absorption at ca. 32,600–32,300  $\text{cm}^{-1}$  while those of the benzophenone-derived thiosemicarbazones exhibit a band at ca. 31,450–31,350  $\text{cm}^{-1}$ . This absorption is attributed to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition of the benzene ring and the  $n \rightarrow \pi^*$  transitions of the azomethine and thioamide functions overlapped in the same envelope [22,23]. In the spectra of the zinc(II) complexes two absorptions were observed at ca. 33,780–31,150  $\text{cm}^{-1}$  and ca. 30,770–29,940  $\text{cm}^{-1}$  for the acetophenone-derived thiosemicarbazones and at ca. 31,250–29,850  $\text{cm}^{-1}$  and 27,800–27,300  $\text{cm}^{-1}$  for the benzophenone-derived thiosemicarbazones. The first is attributed to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition of the benzene ring and the second to the  $n \rightarrow \pi^*$  transitions of C=N and C=S [16]. The two separate absorptions observed in the spectra of the complexes are due to the formation of a highly delocalized system upon deprotonation at N2–H, involving the benzene ring and the thiosemicarbazone chain. Hence the  $n \rightarrow \pi^*$  transitions appear at lower energies in the complexes.

### 3.2.3. NMR spectra

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their zinc(II) complexes were recorded in DMSO- $d_6$ . The  $^1\text{H}$  resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortion less enhancement by polarization transfer (DEPT135) experiments.

In the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of HAC3mF (**2**) and HBz3mF (**4**) and their zinc(II) complexes (**6** and **8**) the fluor nucleus couples with neighbor hydrogen and carbon nuclei resulting in splitting of the hydrogen and carbon signals. In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of all complexes the signal of N2–H is absent due to deprotonation and formation of an anionic ligand. The signals of N3–H undergo significant shifts in relation to their position in the free thiosemicarbazones, indicating coordination through the sulfur. The signals of CH<sub>3</sub> from the acetophenone group shift significantly upon complexation suggesting coordination through the imine nitrogen [22]. Upon coordination significant shifts were observed in the  $^{13}\text{C}$  NMR signals especially for C2, C=N, C=S and C9, which also confirms coordination of the thiosemicarbazone through the imine nitrogen and the sulfur in the thiolate form [9,24].

### 3.2.4. X-ray crystallography

In the structure of HAC3mF (**2**) the thiosemicarbazone backbone is almost planar with a mean plane deviation of 0.0293 Å. The compound adopts the *EE* conformation in relation to the C7=N1 and C8–N2 bonds [25] (see Fig. 2). In the molecular packing dimmers are generated by pairs of N–H...S hydrogen bonds ( $d(\text{D}\cdots\text{A}) = 3.8135(16)$  Å;  $\angle(\text{DHA}) = 175.7^\circ$ ) related to each other by an inversion center [26] (Fig. 2).

Fig. 3 shows the molecular structures of  $[\text{Zn}(\text{Ac3mCl})_2]$  (**5**) and  $[\text{Zn}(\text{Bz3mF})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**8a**). The asymmetric unit of **5** contains half of a  $[\text{Zn}(\text{Ac3mCl})_2]$  molecule. In  $[\text{Zn}(\text{Bz3mF})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**8a**) the *meta*-fluorophenyl ring and the DMSO solvent molecules have shown to be twofold disordered; the refined occupancies converged to 72:28 and 54:46, respectively. We may suspect that the structure of **8a** would present higher symmetry in the absence of DMSO and of the disorder in the *meta*-fluorophenyl ring. In fact the distances and angles in the two ligands of complex (**8a**) are not significantly different (see Table 2).

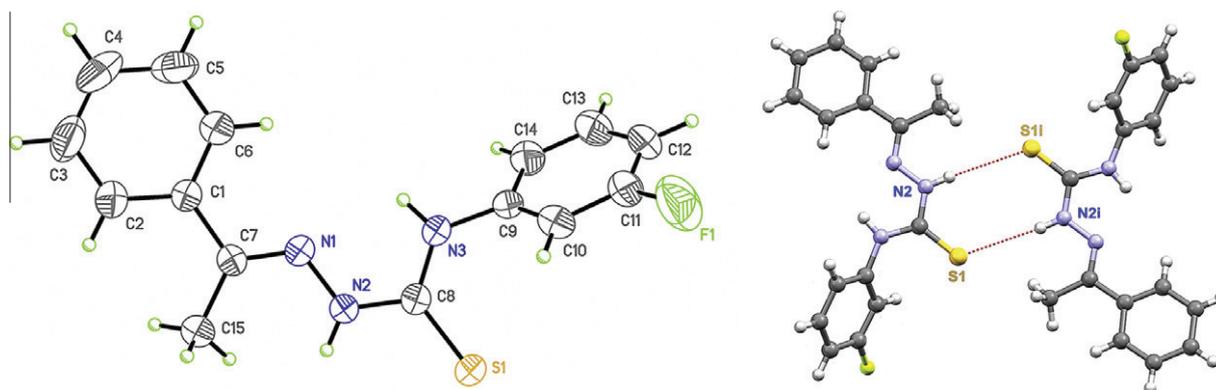
Selected intra-molecular bond distances and angles in the structures of HAC3mF (**2**),  $[\text{Zn}(\text{Ac3mCl})_2]$  (**5**) and  $[\text{Zn}(\text{Bz3mF})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**8a**) are given in Table 2.

In complexes (**5**) and (**8a**) two anionic thiosemicarbazones are attached to the zinc(II) center through the N–S chelating system. The geometry around the metal is highly distorted tetrahedral. The small N1–Zn1–S1 (**5**) and N1–Zn1–S11, N11–Zn1–S101 (**8a**) angles (86.5–87.5°) are very different from the expected angle of 109° for a perfect tetrahedron, probably due to the rigidity of the thiosemicarbazone's N–S chelating system [27]. As a consequence the N1–Zn1–S1' (**5**) and N1–Zn1–S101, N11–Zn1–S1 (**8a**) angles are 137.45(9)° in **5** and 129.02(4)°, 128.81(4)° in **8a**. The sum of the N1–Zn1–S1, N1–Zn1–S1', N1'–Zn1–S', N1'–Zn1–S1 angles is 442.7° for complex (**5**) and the sum of the equivalent angles in complex (**8a**) are 446.16° and 445.38°, while the sum of the four angles of a perfect tetrahedron is 437.88°. Hence, as already mentioned, the geometries of **5** and **8a** are highly distorted tetrahedral.

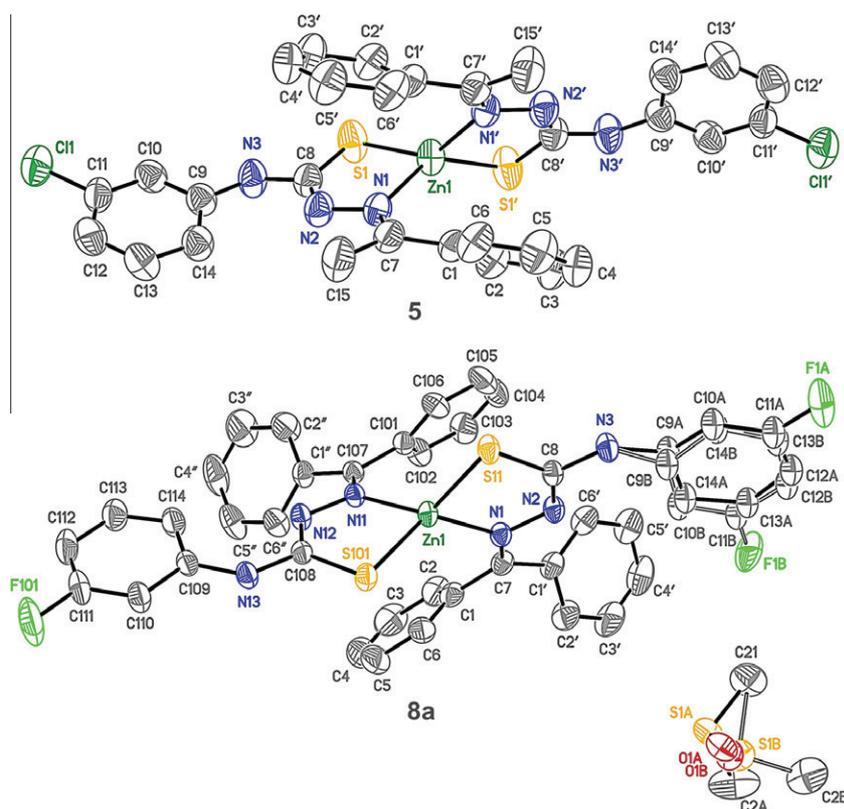
In complexes (**5**) and (**8a**) the coordinated thiosemicarbazone adopts the *EZ* conformation in relation to the C7–N1 and N2–C8 bonds.

Comparison between complexes (**5**) and (**8a**) reveals that the two compounds present comparable bond distances. In general the bond angles of the thiosemicarbazone chain in the two complexes are also not significantly different. However, the angles comprising the metal are not similar.

Considering that the bond distances do not significantly vary in complexes (**5**) and (**8a**) in spite of the fact that **5** contains a chloro substituent while **8a** contains a fluor substituent at the N(3)-phenyl group, comparisons of bond distances could in principle be made



**Fig. 2.** Molecular structure of HAC3mF (**2**) showing the labelling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level (left) together with the N–H...S hydrogen bonds indicated by dashed lines (right).



**Fig. 3.** Molecular structures of  $[\text{Zn}(\text{Ac}3\text{mCl})_2]$  (**5**) and  $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mF})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**8a**) showing the labelling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level. In **5**, the “prime” atoms were generated by  $[-x, y, -z + 1/2]$ .

**Table 2**

Selected bonds distances (Å), and angles ( $^\circ$ ) for HAC3mF (**2**),  $[\text{Zn}(\text{Ac}3\text{mCl})_2]$  (**5**) and  $[\text{Zn}(\text{Bz}3\text{mF})_2]\cdot\text{DMSO}$  (**8a**). Standard deviation in parenthesis.

Atoms	(2)	Atoms	(5)	Atoms	(8a)
<i>Distance (Å)</i>					
–	–	Zn1–N1	2.075(3)	Zn1–N1/Zn1–N11	2.0537(14)/2.0566(14)
–	–	Zn1–S1	2.2884(11)	Zn1–S101/Zn1–S11	2.2849(5)/2.2726(5)
S1–C8	1.670(2)	S1–C8	1.738(4)	S11–C8/S101–C108	1.7513(18)/1.7470(17)
N1–C7	1.281(2)	N1–C7	1.309(5)	N1–C7/N11–C107	1.304(2)/1.302(2)
N1–N2	1.374(2)	N1–N2	1.387(4)	N1–N2/N11–N12	1.391(2)/1.3885(19)
N2–C8	1.354(2)	N2–C8	1.283(5)	N2–C8/N12–C108	1.298(2)/1.302(2)
N3–C8	1.341(3)	N3–C8	1.379(5)	N3–C8/N13–C108	1.369(2)/1.365(2)
<i>Angles (<math>^\circ</math>)</i>					
–	–	N1'–Zn1–N1	107.80(16)	N1–Zn1–N11	115.01(6)
–	–	S1'–Zn1–S1	111.82(6)	S101–Zn1–S11	114.561(19)
–	–	N1–Zn1–S1	85.63(8)	N1–Zn1–S11/N11–Zn1–S101	87.57(4)/87.00(4)
–	–	N1–Zn1–S1'	137.45(9)	N1–Zn1–S101/N11–Zn1–S1	129.02(4)/128.81(4)
–	–	C8–S1–Zn1	93.21(14)	C8–S11–Zn1/C108–S101–Zn1	92.30(6)/92.47(6)
C7–N1–N2	118.94(17)	C7–N1–N2	113.9(3)	C7–N1–N2/C107–N11–N12	115.28(14)/114.87(14)
N1–N2–C8	119.17(16)	N1–N2–C8	115.2(3)	N1–N2–C8/N11–N12–C108	115.90(14)/116.00(14)
N2–C8–S1	119.81(15)	N2–C8–S1	129.0(3)	N2–C8–S11/N12–C108–S101	128.44(13)/128.17(13)
S1–C8–N3	125.62(15)	N3–C8–S1	113.1(3)	N3–C8–S11/N13–C108–S101	113.64(13)/113.97(13)
N3–C8–N2	114.52(17)	N3–C8–N2	117.9(4)	N2–C8–N3/N12–C108–N13	117.91(16)/117.86(15)

<sup>a</sup> Symmetry operation: ' =  $-x, y, -z + 1/2$ .

between HAC3mF (**2**) and the acetophenone thiosemicarbazone complex (**5**). C8–S1, which is a predominantly double bond, varies from 1.670(2) Å in **2** to 1.738(4) Å in **5** as a consequence of deprotonation with formation of a new predominantly single bond [28]. The N2–C8 bond goes from 1.354(2) Å in **2** to 1.283(5) Å in **5** due to this same effect. Significant modifications were observed as well in the bond angles involving the sulfur atom in **2** and **5**.

We were not able to grow crystals of complexes (**6**) and (**7**) but considering that both **5** and **8a** are highly distorted tetrahedral we may assume that **6** and **7** probably present the same geometry.

#### 4. Conclusions

*N*(3)-*meta*-chlorophenyl- and *N*(3)-*meta*-fluorophenyl thiosemicarbazones derived from acetophenone and benzophenone coordinate to zinc(II) forming  $[\text{Zn}(\text{L}_2)]$  (L = anionic thiosemicarbazone) complexes, in which the bidentate thiosemicarbazone ligands adopt the *EZ* conformation in relation to the C7–N1 and N2–C8 bonds.

The presence of triethylamine in the reaction mixture induced deprotonation at N(2)–H and the excess of zinc(II) probably

avored formation of tetrahedral  $[Zn(L_2)]$  ( $L =$  anionic thiosemicarbazone) instead of octahedral  $[Zn(L)_3]$  complexes. In addition, since the  $d^{10}$  configuration of zinc(II) affords no crystal field stabilization, the presence of rather bulky thiosemicarbazone ligands also probably contributed to the formation of tetrahedral species. Moreover, the rigidity of the thiosemicarbazone's N–S chelating system is responsible for the highly distorted tetrahedral geometry of the complexes.

#### Appendix A. Supplementary material

CCDC 844586, 844587 and 844588 contain the supplementary crystallographic data for thiosemicarbazone (**2**) and complexes (**5**) and (**8a**). 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 336033; or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk). Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.molstruc.2011.11.035.

#### References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 159.
- [2] R.A. Finch, M.C. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y.C. Cheng, A.C. Sartorelli, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 983.
- [3] D. Kovala-Demertzi, P.N. Yadav, J. Wiecek, S. Skoulika, T. Varadinova, M.A. Demertzi, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 467.
- [4] N.C. Kasuga, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, S. Nakano, N. Shimada, C. Koumo, K. Nomiya, *J. Inorg. Biochem.* 96 (2003) 298.
- [5] N. Farrell, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 1.
- [6] W. Maret, *BioMetals* 22 (2009) 149.
- [7] G.K. Walkup, S.C. Burdette, S.J. Lippard, R.Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 5644.
- [8] D. Kovala-Demertzi, P.N. Yadav, J. Wiecek, S. Skoulika, T. Varadinova, M.A. Demertzi, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1558.
- [9] J.G. Da Silva, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *J. Coord. Chem.* 62 (2009) 1400.
- [10] CRYCALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.34.34 (release 05-01-2010 CrysAlis171.NET).
- [11] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112.
- [12] V.T. Siatra-Papastaikoudi, A. Tsotinis, C.P. Raptopoulou, C. Sambani, H. Thomou, *Eur. J. Med. Chem.* 30 (1995) 107.
- [13] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [14] A.L. Spek, *Acta Crystallogr. D* 65 (2009) 148.
- [15] D.X. West, A. Castineiras, E. Bermejo, *J. Mol. Struct.* 520 (2000) 103.
- [16] E.B. Seena, K. Prathapachandra, *Spectrochim. Acta Part A* 69 (2008) 726.
- [17] D.X. West, I.S. Billeh, J.P. Jasinski, J.M. Jasinski, R.J. Butcher, *Transition Met. Chem.* 23 (1998) 209.
- [18] I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, *Polyhedron* 26 (2007) 3263.
- [19] K. Alomar, A. Landreau, M. Kempf, M.A. Khan, M. Allain, G. Bouet, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 397.
- [20] A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *J. Mol. Struct.* 920 (2009) 97.
- [21] G.L. Parrilha, R.P. Vieira, A.P. Rebolledo, I.C. Mendes, L.M. Lima, E.J. Barreiro, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 1891.
- [22] H. Beraldo, W.F. Nacif, L.R. Teixeira, J.S. Rebouças, *Transition Met. Chem.* 27 (2002) 85.
- [23] H. Beraldo, R. Lima, L.R. Teixeira, A.A. Moura, D.X. West, *J. Mol. Struct.* 559 (2001) 99.
- [24] T.P. Stanojkovic, D. Kovala-Demertzi, A. Primikyri, I. Garcia-Santos, A. Castineiras, Z. Juranic, M.A. Demertzi, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 467.
- [25] J.S. Casas, M.S. Garcia-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.* 209 (2000) 197.
- [26] J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. da Silva, M.A. Soares, R.G. Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671.
- [27] L. Latheef, E. Manoj, M.R.P. Kurup, *Polyhedron* 26 (2007) 4107.
- [28] K.S.O. Ferraz, L. Fernandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.F. Leite, E.M. Souza-Fagundes, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7138.



## Original article

# Investigation on the pharmacological profile of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes

Karina S.O. Ferraz<sup>a</sup>, Nayane F. Silva<sup>a</sup>, Jeferson G. da Silva<sup>a</sup>, Luana F. de Miranda<sup>b</sup>, Carla F.D. Romeiro<sup>b</sup>, Elaine M. Souza-Fagundes<sup>b</sup>, Isolda C. Mendes<sup>c</sup>, Heloisa Beraldo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

<sup>c</sup>Escola de Belas Artes, Departamento de Artes Plásticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 January 2012

Received in revised form

15 March 2012

Accepted 21 March 2012

Available online 29 March 2012

## Keywords:

2,6-Diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives

Antimony(III) complexes

Bismuth(III) complexes

Pharmacological profile

Crystal structures

## ABSTRACT

Complexes [Sb(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (1), [Sb(HAcClPh)Cl<sub>2</sub>] (2), [Sb(HAcNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (3) and [Bi(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (4), [Bi(HAcClPh)Cl<sub>2</sub>] (5), [Bi(HAcNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (6) were obtained with 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) (H<sub>2</sub>AcPh), 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H<sub>2</sub>AcClPh), and 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-nitrobenzoylhydrazone) (H<sub>2</sub>AcNO<sub>2</sub>Ph). The bis(benzoylhydrazones) were inactive as antimicrobial agents against *gram*-positive and *gram*-negative bacteria and against *Candida albicans* but upon coordination to antimony(III) and bismuth(III) antimicrobial activity was demonstrated. The studied compounds were tested for their cytotoxic activities against Jurkat and HL60 (leukemia), MCF-7 (breast tumor), HCT-116 (colorectal carcinoma) and peripheral blood mononuclear (PBMC) cells. All bis(benzoylhydrazones) proved to be poorly cytotoxic. Upon coordination of the bis(benzoylhydrazones) to antimony(III) and bismuth(III) cytotoxicity significantly improved. Complex (5) presented high therapeutic indexes (TI = 11–508) against all cell lineages.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Antimony and bismuth are elements of the periodic table group 15. Bismuth compounds such as bismuth subnitrate, subcarbonate, subgallate and subsalicylate are used orally in medicine for antacid action. Bismuth compounds are employed in combination with antibiotics in the treatment of ulcer caused by *Helicobacter pylori* [1]. In addition, the antitumor effect of some bismuth compounds has been demonstrated [2]. The antitumor activity of antimony compounds has been demonstrated by other authors [2–4] and by some of us [5]. Antimony compounds may also present antimicrobial properties [6]. However, the major clinical use of antimony compounds is as a treatment for Leishmaniasis [7–9].

On coordination to metals, bioactive ligands may improve their bioactivity profiles [10,11], while inactive ligands may acquire pharmacological properties [12]. In addition, metal coordination is one of the most efficient strategies in the design of repository, slow-release or long-acting drugs [13].

Hydrazones are an interesting class of compounds due to their versatility in coordinating to metals, their conformational flexibility, their use in analytical methods and their pharmacological activity. Hydrazones are used as selective metal extracting agents as well as in spectroscopic determination of certain transition metals [14]. Hydrazone derivatives are found to possess antimicrobial [15,16], anti-tubercular [17], anti-convulsing [15,18] and anti-inflammatory [19,20] activities. Some hydrazone analogs have been investigated as potential oral iron chelating agents with applications in the treatment of thalassemia [21,22] and neurodegenerative disorders such as Alzheimer disease [23,24].

The chelating properties of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazones) have been investigated [12,25], and some works report on their pharmacological properties [12]. In the present work bismuth(III) and antimony(III) complexes were prepared with 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) (H<sub>2</sub>AcPh), 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H<sub>2</sub>AcClPh), and 2,6-diacetylpyridine bis(*para*-nitrobenzoylhydrazone) (H<sub>2</sub>AcNO<sub>2</sub>Ph) (Fig. 1). The antimicrobial properties and the cytotoxic activities of the studied compounds against human tumor and peripheral blood mononuclear cell lines have been investigated.

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 5740; fax: +55 31 3409 5700.  
E-mail address: [hberaldo@ufmg.br](mailto:hberaldo@ufmg.br) (H. Beraldo).

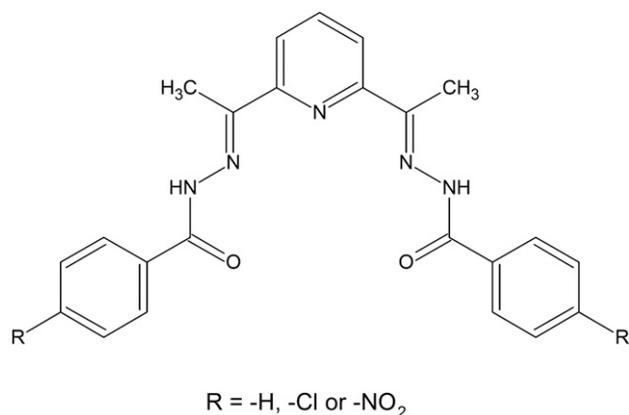


Fig. 1. General structure of 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazones).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Formation of the antimony(III) and bismuth(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of  $[M(HL)Cl_2]$ ,  $M = Sb(III)$ ,  $Bi(III)$ , in which a mono-anionic *bis*(benzoylhydrazone) is attached to the metal center together with two chloride ions.

### 2.2. Spectroscopic characterization

#### 2.2.1. Infrared spectra

The vibrations attributed to  $\nu(C=N)$  at  $1576\text{--}1568\text{ cm}^{-1}$  in the infrared spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) shift to  $1523\text{--}1514\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of complexes (**1–6**), in agreement with coordination of the azomethine nitrogen [26–29]. The  $\nu(C=O)$  absorption observed at  $1771\text{--}1664\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) shifts to  $1686\text{--}1645\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of complexes (**1–6**), indicating coordination through the oxygen. Upon coordination the vibrations attributed to  $\nu(N-H + C=N)$  at  $1267\text{--}1247\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) shift to  $1274\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of **1–6**, in accordance with the presence of at least one N–H bond, as suggested by microanalyses and molar conductivity data.

The vibrations attributed to  $\nu(N-H + C=N)$  and to  $\nu(C=O)$  disappear in the spectra of complexes  $[Sb(AcpClPh)Cl]$  (**2a**) and  $[Bi(AcpNO_2Ph)(DMSO)Cl]$  (**6a**), obtained upon recrystallization of **2** and **6** in 1:9 DMSO/acetone, indicating deprotonation of both arms of the *bis*(benzoylhydrazone).

The in-plane deformation mode of the pyridine ring at  $660\text{--}634\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of the uncomplexed *bis*(benzoylhydrazones) shifts to  $679\text{--}670\text{ cm}^{-1}$  in complexes (**1–6**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [26–29].

In the spectra of complexes (**1–3**) the absorptions at  $519\text{--}517\text{ cm}^{-1}$  and  $385\text{--}359\text{ cm}^{-1}$  were attributed to the  $\nu(Sb-N)$  [5] and  $\nu(Sb-O)$  [30] vibrations, respectively, and those at  $254\text{--}225\text{ cm}^{-1}$  to the  $\nu(Sb-N_{py})$  vibration [5]. The absorption at  $214\text{--}200\text{ cm}^{-1}$  was attributed to the  $\nu(Sb-Cl)$  vibration. Similarly, in complexes (**4–6**) the absorptions at  $519\text{--}469\text{ cm}^{-1}$  and  $362\text{--}335\text{ cm}^{-1}$  were attributed to the  $\nu(Bi-N)$  and  $\nu(Bi-O)$  vibrations, respectively, and those at  $256\text{--}252\text{ cm}^{-1}$  to the  $\nu(Bi-N_{py})$  vibration. The absorption at  $204\text{--}193\text{ cm}^{-1}$  was assigned to the  $\nu(Bi-Cl)$  vibration [30]. Therefore in the complexes the *bis*(benzoylhydrazones) are attached to the metal through the O–N–N<sub>py</sub>–N–O chelating system.

### 2.2.2. NMR spectra

The NMR spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) and their antimony(III) and bismuth(III) complexes were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub> because this is the only solvent which dissolves all ligands and complexes. The <sup>1</sup>H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

The signals of all hydrogens and carbons undergo significant shifts in complexes (**1–6**) relative to their position in the uncomplexed *bis*(benzoylhydrazones). In the <sup>1</sup>H NMR spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) the signals of N3–H at  $\delta$  10.76–11.30 are characteristic of the *E* configuration, in which N3–H is hydrogen bonded to the solvent [26–29]. Integration is compatible with the presence of two hydrogens. In the spectra of all antimony(III) and bismuth(III) complexes integration reveals the presence of one hydrogen, indicating that the *bis*(benzoylhydrazones) coordinate as monoanionic ligands. Hence in **1–6** only one of the arms in the *bis*(benzoylhydrazone) ligands undergo deprotonation at N3–H, as indicated by microanalyses and molar conductivity data. The signals of C7 undergo significant shifts on coordination, in accordance with complexation through de imine carbon. However, due to the low solubility of the complexes we were unable to assign the signals of C8.

### 2.3. X-ray diffraction analyses

As already mentioned, crystals of  $[Sb(AcpClPh)Cl]$  (**2a**) and  $[Bi(AcpNO_2Ph)(DMSO)Cl]$  (**6a**) were obtained from slow evaporation of complexes (**2**) and (**6**), respectively, in 1:9 DMSO/acetone.

Table 1 shows selected bond distances and angles in the structures of **2a** and **6a**. As shown in Fig. 2, in the molecular structure of complex (**2a**) a pentadentate *bis*(benzoylhydrazone) dianionic ligand and one chloride ion are attached to the antimony(III) center. Hence deprotonation at the second imine nitrogen occurred upon recrystallization. Concerning the geometry around the metal center, the O(1), O(1'), N(1), N(2), N(2') atoms from the *bis*(benzoylhydrazone) are located in the basal plane and the Cl(1) atom occupies the apical position of a pentagonal pyramidal arrangement. In fact the geometry in **2a** could be considered either a pentagonal pyramid formed by the O–N–N<sub>py</sub>–N–O chelating system of the *bis*(benzoylhydrazone) in the basal plane and the chloride ion in the apical position of a hexa-coordinated metal center, or a pentagonal bipyramid with the antimony 5s<sup>2</sup> lone pair occupying the seventh coordination position of a pseudo hepta-coordinated metal center [31].

$[Bi(AcpNO_2Ph)(DMSO)Cl]$  (**6a**) is hepta-coordinated and has a pentagonal bipyramid geometry around bismuth(III). The *bis*(benzoylhydrazone) acts as a pentadentate dianionic ligand which is attached to the metal through three nitrogen [N(1), N(2) and N(2')] and two oxygen [O(1) and O(1')] atoms in the equatorial plane. Thus once again deprotonation at N3–H in the second arm of the *bis*(benzoylhydrazone) ligand occurred upon recrystallization. The apices of the bipyramid are filled by a chloride ion and the oxygen atom from a DMSO molecule. Similar hepta-coordinated complexes with pentagonal bipyramidal geometry have been previously reported [25,31]. In addition, deprotonation upon recrystallization had been previously observed by some of us for copper(II) and zinc(II) complexes with hydrazones [26–28].

In the structures of **2a** and **6a**, due to the geometric requirements of the *bis*(benzoylhydrazone) ligand the O(1)–M–O(1') angle is remarkably larger than the other four angles involving the metal and the O–N–N–N–O chelating system (see Table 1). The central angle of a regular pentagon is 72°, while the

**Table 1**  
Bond lengths [Å] and angles [°] for [Sb(AcpClPh)Cl] (**2a**) and [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)(DMSO)Cl] (**6a**).

	( <b>2a</b> )	( <b>6a</b> )
Bond lengths (Å)		
M(1)–O(1)	2.235(6)	2.461(2)
M(1)–O(1')	2.250(6)	2.436(2)
M(1)–N(2)	2.318(7)	2.494(2)
M(1)–N(2')	2.353(7)	2.446(2)
M(1)–N(1)	2.379(6)	2.451(2)
M(1)–Cl(1)	2.399(2)	2.4951(8)
O(1')–C(8')	1.262(10)	1.281(3)
O(1)–C(8)	1.272(10)	1.275(3)
N(3)–C(8)	1.342(11)	1.316(4)
N(3')–C(8')	1.325(11)	1.317(3)
N(3)–N(2)	1.377(11)	1.372(3)
N(2')–N(3')	1.383(11)	1.369(3)
N(2)–C(7)	1.350(12)	1.290(4)
N(2')–C(7')	1.281(11)	1.287(3)
Angles (°)		
O(1)–M(1)–O(1')	84.5(2)	99.53(6)
O(1)–M(1)–N(2)	67.5(2)	63.84(7)
O(1')–M(1)–N(2)	149.2(3)	159.75(7)
O(1)–M(1)–N(2')	149.7(3)	162.29(7)
O(1')–M(1)–N(2')	68.4(2)	64.99(7)
N(2)–M(1)–N(2')	133.5(2)	128.95(8)
O(1)–M(1)–N(1)	135.5(2)	128.66(7)
O(1')–M(1)–N(1)	133.4(2)	130.03(7)
N(2)–M(1)–N(1)	69.2(3)	64.85(8)
N(2')–M(1)–N(1)	66.0(2)	65.23(7)
O(1)–M(1)–Cl(1)	82.6(2)	84.97(6)
O(1')–M(1)–Cl(1)	82.8(2)	85.76(6)
N(2)–M(1)–Cl(1)	81.0(2)	81.48(6)
N(2')–M(1)–Cl(1)	80.7(2)	85.30(6)
N(1)–M(1)–Cl(1)	81.1(1)	86.15(5)
C(8')–O(1')–M(1)	117.1(5)	115.59(17)
C(8)–O(1)–M(1)	117.5(5)	116.59(18)
C(7)–N(2)–M(1)	120.5(6)	121.68(18)
C(7')–N(2')–M(1)	122.1(6)	121.85(19)
N(3')–N(2')–M(1)	116.6(5)	119.85(16)
N(3)–N(2)–M(1)	120.1(5)	119.87(17)
Cl(1)–Bi(1)–O(21)	–	162.35(7)

O(1)–M–O(1') angle in **2a** and **6a** are 84.5(2)° and 99.53(6)°, respectively. In contrast, the O(1)–M(1)–N(2) and O(1')–M(1)–N(2') angles are 67.5(2)° and 68.4(2)° in **2a** and 63.84(7)° and 64.99(7)° in **6a**, respectively.

In both complexes (**2a**) and (**6a**) each arm of the *bis*(benzoylhydrazone) adopts the *EZ* configuration in relation to the C7–N2 and N3–C8 bonds. In 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and *bis*(hydrazones) the C8–O1, C7–N2 and

C8–N3 bonds are in the 1.217–1.230 Å, 1.264–1.286 Å and 1.347–1.363 Å ranges, respectively [26,32–34]. In complexes (**2a**) and (**6a**) the C8–O1 bonds are 1.262(10) Å and 1.272(10) Å in **2a** and 1.281(3) Å and 1.275(3) Å in **6a**. Hence the C8–O1 bonds acquired some single bond character in both **2a** and **6a**. In **6a** the C7–N2 and N3–C8 bonds are 1.290(4) Å; 1.287(3) Å and 1.316(4) Å; 1.317(3) Å, respectively. Hence C7–N2 are predominantly double bonds while the determined C8–N3 distances are intermediate but closer to those of a double bond.

Interestingly, extremely different C7–N2 and C8–N3 bond distances were found in the structure of **2a** (C7–N2 = 1.350(12) Å; 1.281(11) Å and C8–N3 = 1.342(11) Å; 1.325(11) Å), revealing the presence of two asymmetric arms.

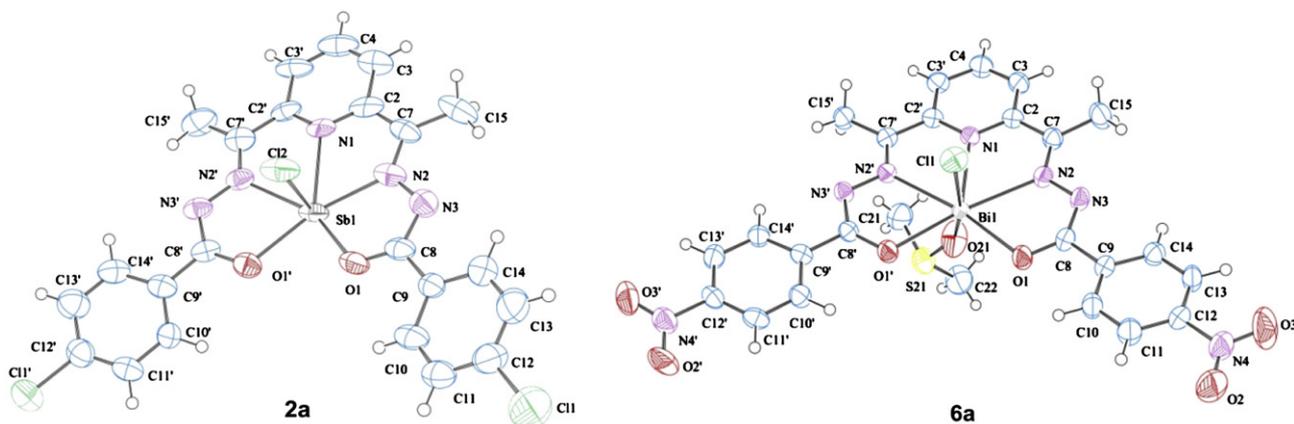
In **2a** and **6a** the *bis*(benzoylhydrazone) anion is nearly planar [rms deviation of atoms from the least-squares plane of 0.0167 Å (**2a**) and 0.0553 Å (**6a**)] with the metal ion laying close onto this plane [at 0.333(3) Å (**2a**) and 0.224(1) Å (**6a**), respectively]. The higher planarity of the chelating system in **2a** could possibly explain the differences in the structures of **2a** and **6a**.

#### 2.4. Antimicrobial activity

Table 2 reports the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the studied compounds against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The *bis*(benzoylhydrazones) were inactive against all microorganisms.

In general, upon coordination to antimony(III) the compounds showed antimicrobial activity. Among the antimony(III) complexes, the lowest MIC values were found for [Sb(HAcpClPh)Cl<sub>2</sub>] (**2**), which was the most active antimony(III) complex against *S. aureus* and *E. faecalis* (MIC = 24.1 and 9.7 μM, respectively). Complex (**3**) showed low antimicrobial activity. These results suggest that the presence of the *para*-chloro substituent favored antimicrobial activity in the complex while substitution with the *para*-nitro group resulted in a poorly active complex.

Upon coordination to bismuth(III) the antimicrobial activity significantly increased against all *gram*-positive bacteria and to a lesser extent against *gram*-negative *P. aeruginosa*. The bismuth(III) complexes were more active than their antimony(III) analogs. Complexes (**5**) and (**6**) proved to be more active against *S. aureus* than tetracycline, used as positive control, and presented a good activity against the growth of *E. faecalis*. On complexation to bismuth(III) the antimicrobial activity also increased against *C. albicans*. Again, complexes (**5**) and (**6**) proved to be the most active, **5** being more effective than fluconazole, the drug employed



**Fig. 2.** Molecular plot of [Sb(AcpClPh)Cl] (**2a**) and [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)(DMSO)Cl] (**6a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

**Table 2**  
Antimicrobial activity of the bis(benzoylhydrazones) and their antimony(III) and bismuth(III) complexes.

Compound	MIC ( $\mu\text{M}$ )				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<b>H<sub>2</sub>AcPh</b>	NA	NA	NA	NA	NA
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>1</b> )	220.8	NA	43.6	406.0	431.0
[Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>4</b> )	9.4	9.2	4.5	90.3	188.0
<b>H<sub>2</sub>AcpCl</b>	NA	NA	NA	NA	NA
[Sb(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> )	24.1	NA	9.7	409.0	NA
[Bi(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>5</b> )	0.3	65.6	2.0	344.6	44.0
<b>H<sub>2</sub>AcpNO<sub>2</sub></b>	NA	NA	NA	NA	NA
[Sb(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> )	NA	NA	NA	NA	193.0
[Bi(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	0.2	16.8	1.0	109.7	85.0
SbCl <sub>3</sub>	124.0	NA	110.0	2115.0	NA
BiCl <sub>3</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
Tetracyclin	7.2	–	–	26.7	–
Fluconazole	–	–	–	–	59.0
Ciprofloxacin	–	0.3	0.5	–	–

NA – not active; ND – not determined.

as positive control. All complexes were less active than ciprofloxacin against *S. epidermidis* and *E. faecalis*.

### 2.5. Cytotoxic activity

Table 3 shows the IC<sub>50</sub> values of the bis(benzoylhydrazones) and their antimony(III) and bismuth(III) complexes against Jurkat and HL60 leukemia cells, MCF-7 and HCT-116 solid tumor cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In general, it was shown that HL60 cells were more susceptible to all compounds than the Jurkat, MCF-7 and HCT-116 cell lines.

The bis(benzoylhydrazones) proved to be cytotoxic to HL60 cells but were poorly active against Jurkat, MCF-7 and HCT-116 cell lines, with IC<sub>50</sub> values higher than 100  $\mu\text{M}$ , except for H<sub>2</sub>AcPh against MCF-7 cells (IC<sub>50</sub> = 41.15  $\mu\text{M}$ ). H<sub>2</sub>AcPh revealed to be the most cytotoxic compound. The presence of the *para*-chloro and *para*-nitro substituents resulted in decreased cytotoxicity.

Although SbCl<sub>3</sub> exhibited poor cytotoxic activity, after coordination of the bis(benzoylhydrazones) to antimony(III), except for complex [Sb(HAcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (**3**), cytotoxicity significantly increased against HL60 and MCF-7 cell lines (IC<sub>50</sub> = 0.36–2.46  $\mu\text{M}$ ). [Sb(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (**1**) and [Sb(HAcpClPh)Cl<sub>2</sub>] (**2**) were more active than cisplatin used as a reference against HL60 and MCF-7 cells. Since both the bis(benzoylhydrazones) and the antimony(III) salt showed low cytotoxic activity the cytotoxic effect of **1** and **2** could be attributed to the complex as an entity.

Coordination to bismuth(III) revealed to be a better strategy to increase cytotoxic activity of the bis(benzoylhydrazones). [Bi(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (**4**), [Bi(HAcpClPh)Cl<sub>2</sub>] (**5**) and [Bi(HAcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (**6**)

were more active than their antimony(III) congeners. In general, **4–6** were more active than cisplatin. Among the bismuth(III) complexes, **4** revealed to be the most active against all tumor cell lines. The presence of the *para*-chloro and *para*-nitro groups in the bis(benzoylhydrazone) ligand resulted in a decrease in cytotoxicity of the bismuth(III) complexes. We were unable to assay the cytotoxic effect of BiCl<sub>3</sub> due to its low solubility, but from the results obtained with SbCl<sub>3</sub> we may infer that the cytotoxic effect of the bismuth(III) complexes is probably due to the complex as an entity and not only to the presence of the metal.

The cytotoxicity of the studied compounds was also evaluated in normal cells. We used human PBMC as a predictive model. As shown in Table 3, although complex (**4**) presented the highest cytotoxicity against the investigated tumor cell lines, **5** was the best antitumor drug candidate due to its higher therapeutic indexes [TI = IC<sub>50</sub>(PBMC)/IC<sub>50</sub>(tumor cell)]. In fact the TI values of **5** were 11 (Jurkat), 508 (HL60), 109 (MCF-7) and 11 (HCT-116). Complex (**6**) presented TI = 11 (Jurkat), 114 (HL60), 43 (MCF-7) and 6 (HCT-116). The antimony(III) complexes (**1–3**) also presented good therapeutic indexes (TI = 5–231) against HL60 cells and TI = 43 for complex (**2**) against MCF-7 cells. In contrast, the determined IC<sub>50</sub> for cisplatin against PBMC cells was 3.37, and its calculated TI values <<1 against all cancer cell lines indicate its high toxicity to normal cells.

### 2.6. Investigation on the pro-apoptotic potential of the bis(benzoylhydrazones) and complexes (**4–6**)

The acquired ability to resist to apoptosis is a hallmark of most types of tumors. Therefore, induction of apoptosis, or programmed

**Table 3**  
Cytotoxic activity (IC<sub>50</sub>) of bis(benzoylhydrazones) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes on Jurkat, HL60, MCF-7, HCT-116 and PBMC cell lines.

Compound	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) 95% Confidence interval in parenthesis				
	Jurkat	HL60	MCF-7	HCT-116	PBMC
<b>H<sub>2</sub>AcPh</b>	>100	0.98 (0.44–2.18)	41.15 (10.93–155.00)	>100	85.92 (20.29–363.80)
[Sb(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>1</b> )	>100	0.39 (0.19–0.85)	2.46 (1.34–4.52)	>100	36.48 (6.96–191.30)
[Bi(HAcPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>4</b> )	1.29 (0.57–2.92)	0.09 (0.04–0.18)	0.27 (0.18–0.41)	2.83 (2.13–3.77)	1.29 (0.22–7.43)
<b>H<sub>2</sub>AcpClPh</b>	>100	1.78 (0.83–3.82)	>100	>100	>100
[Sb(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>2</b> )	>100	0.36 (0.16–0.79)	1.93 (0.86–4.33)	>100	83.32 (13.03–532.8)
[Bi(HAcpClPh)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>5</b> )	10.56 (3.77–29.57)	0.23 (0.11–0.47)	1.07 (0.67–1.73)	10.22 (7.67–13.61)	117.0 (10.7–1278.0)
<b>H<sub>2</sub>AcpNO<sub>2</sub>Ph</b>	>100	2.60 (1.42–4.78)	>100	>100	>100
[Sb(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>3</b> )	>100	21.72 (8.553–55.16)	>100	>100	>100
[Bi(HAcpNO <sub>2</sub> Ph)Cl <sub>2</sub> ] ( <b>6</b> )	2.06 (0.92–4.62)	0.20 (0.11–0.38)	0.5403 (0.36–0.81)	3.80 (2.80–5.13)	22.94 (9.99–52.66)
SbCl <sub>3</sub>	>100	67.89 (48.09–95.86)	>100	>100	55.68 (3.05–1015.0)
Cisplatin	14.42 (11.44–18.18)	5.73 (2.29–14.33)	66.83 (24.49–182.30)	22.27 (6.77–73.21)	3.37 (2.67–4.08)

cell death in cancer cells is thought to be fundamental to the success of treatments for cancer [35].

Since coordination of the *bis*(benzoylhydrazones) to bismuth(III) proved to be a better strategy for obtaining novel anticancer drug candidates than coordination to antimony(III), complexes (4–6) were investigated for the mechanism of their antitumor activity and their ability to activate the apoptotic pathway. Hence, we followed DNA fragmentation induced by complexes (4–6). Cells with an increase of subdiploid DNA content, thus with fragmented DNA, were classified as apoptotic cells.

Fig. 3 shows the subdiploid DNA content for the four lineages after incubation with 4–6 and their respective ligands. The data demonstrated distinct lineage-dependent profiles on DNA fragmentation. The order of sensitivity of tumor cells was: HL60 > Jurkat > HCT-116 > MCF-7.

All *bis*(benzoylhydrazones) and complexes (4–6) induced significant DNA fragmentation in HL60 cells, indicating apoptosis to be part of their mode of cytotoxic action against this lineage.

Complex (4) significantly induced DNA fragmentation in Jurkat cells while the *bis*(benzoylhydrazones) and complexes (5) and (6) exerted moderate effect. 4 and 6 appreciably induced DNA fragmentation on HCT-116 cells while the other studied compounds did not exert a strong effect. All complexes (4–6) were more effective than their respective ligands, suggesting coordination to bismuth(III) to be an interesting strategy to promote apoptosis in HCT-116 cells.

The *bis*(benzoylhydrazones) and complexes (4–6) induced moderate DNA fragmentation on MCF-7 cells, suggesting that apoptosis induction is not their main mode of cytotoxic activity against these lineage.

### 3. Conclusions

Although the *bis*(benzoylhydrazones) proved to be almost inactive as antimicrobial and cytotoxic agents, their antimony(III) and bismuth(III) complexes presented antimicrobial and cytotoxic activity. Coordination to bismuth(III) revealed to be a better strategy of antimicrobial and cytotoxic activity improvement. The bismuth(III) complexes exhibited cytotoxic activity at nanomolar doses against HL60 and MCF-7 cells.

Since the *bis*(benzoylhydrazones) revealed to be poorly bioactive, their antimony(III) and bismuth(III) complexes might act by increasing the metals' bioavailability due to the lipophilic character of the ligands ( $\log P = 3.86\text{--}4.96$ ) [36] as well as by slowly releasing the metal to the biological target.

Synergic administration of cisplatin and bismuth compounds is known to reduce the toxic side-effects of cisplatin, an effect that may be traced to the increased production of metallothionein induced by bismuth [2]. Therefore, the study and development of new bismuth-based drugs may be an interesting strategy in anti-cancer therapy.

### 4. Experimental

#### 4.1. Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. The *bis*(benzoylhydrazones) were prepared according to previously reported procedures [37,38].

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was

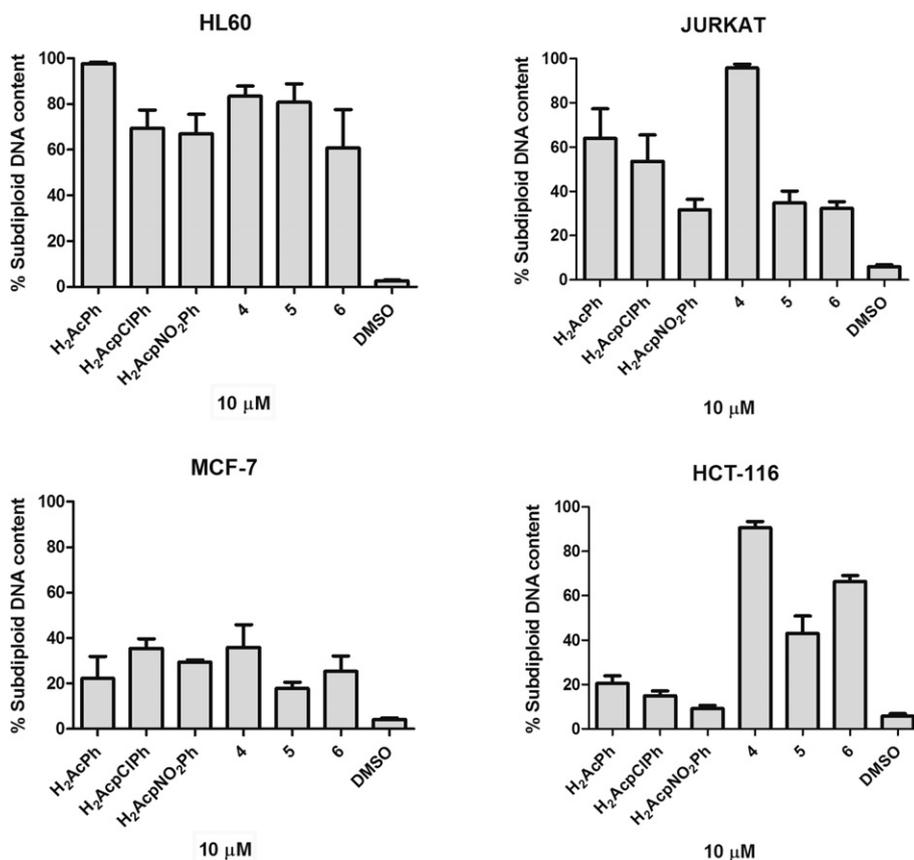


Fig. 3. DNA fragmentation induced by the *bis*(benzoylhydrazones) and their bismuth(III) complexes in HL60, Jurkat, MCF-7 and HCT-116 cells. All cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  of each compound, at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere for 24 h. DNA content was assessed by flow-cytometric analysis of cells labeled with propidium iodide. Each data represents SEM  $\pm$  SD from two different experiments ( $*P < 0.05$ , Student's *t*-test).

employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ) and nujol mulls between CsI plates (400–200  $\text{cm}^{-1}$ ). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 AVANCE (200 MHz) spectrometer using DMSO- $d_6$  as the solvent and TMS as internal reference.

Single crystal X-ray diffraction measurements for **2a** and **6a** were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer using graphite-Enhance Source Mo  $K_\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ). The data collection, cell refinements, and data reduction were performed using the CRYALISPRO software [39]. Semi-empirical from equivalents absorption correction method was applied [39]. The structures were solved by direct methods using SHELXS-97 [39]. Full-matrix least-squares refinement procedure on  $F^2$  with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-97 [40]. 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.

#### 4.2. Synthesis of antimony(III) and bismuth(III) complexes with 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone), 2,6-diacetylpyridine bis(para-chlorobenzoylhydrazone), and 2,6-diacetylpyridine bis(para-nitrobenzoylhydrazone) [Sb(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (1), [Sb(HAcPcIPh)Cl<sub>2</sub>] (2), [Sb(HAcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (3), [Bi(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (4), [Bi(HAcPcIPh)Cl<sub>2</sub>] (5), [Bi(HAcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (6)

The antimony(III) and bismuth(III) complexes were obtained by stirring under reflux an ethanol solution of the desired bis(benzoylhydrazone) (1.0 mmol) with an equimolar amount of SbCl<sub>3</sub> or BiCl<sub>3</sub>, (purity  $\geq 99.99\%$ , added as powders) for 3 h. The resulting solids were washed with ethanol, diethylether and then dried in vacuum.

##### 4.2.1. [Sb(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (1)

Orange solid. Yield: 69%. Anal. Calcd. C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>SbCl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (591.10): C, 46.73; H, 3.41; N, 11.85. Found: C, 46.74; H, 3.21; N, 11.82%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DMF): 25.48  $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . IR (KBr, Csl/nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1668s,  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$  1515m,  $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$  1489s,  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  1267s,  $\rho(\text{py})$  671w,  $\nu(\text{M} - \text{N})$  517w,  $\nu(\text{M} - \text{O})$  359m,  $\nu(\text{M} - \text{Npy})$  255m,  $\nu(\text{M} - \text{Cl})$  214w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.50 (1H, d,  $J_{\text{H}} = 7.62 \text{ Hz}$ , H(3)), 8.64 (1H, t,  $J_{\text{H}} = 7.80 \text{ Hz}$ , H(4)), 8.19 (2H, m, H(10)), 7.68 (2H, m, H(11)), 2.88 (6H, s, H(15)), 11.86 (1H, s, N(3)H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 143.37, C4; 128.66, C10; 128.57, C11; 15.15, C15.

##### 4.2.2. [Sb(HAcPcIPh)Cl<sub>2</sub>] (2)

Orange solid. Yield: 82%. Anal. Calcd. C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>SbCl<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (659.99): C, 41.92; H, 2.60; N, 10.63. Found: C, 42.15; H, 2.58; N, 10.72%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DMF): 21.06  $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . IR (KBr, Csl/nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1681s,  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$  1514m,  $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$  1482s,  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  1250s,  $\rho(\text{py})$  679w,  $\nu(\text{M} - \text{N})$  519w,  $\nu(\text{M} - \text{O})$  361m,  $\nu(\text{M} - \text{Npy})$  246m,  $\nu(\text{M} - \text{Cl})$  208w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.52 (1H, d,  $J_{\text{H}} = 7.48 \text{ Hz}$ , H(3)), 8.65 (1H, t,  $J_{\text{H}} = 7.94 \text{ Hz}$ , H(4)), 8.19 (2H, d,  $J_{\text{H}} = 7.83 \text{ Hz}$ , H(10)), 7.66 (2H, m, H(11)), 2.88 (6H, s, H(15)), 11.05 (1H, s, N(3)H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 153.86, C7=N; 143.46, C4; 128.70, C10; 130.55, C11; 15.28, C15.

##### 4.2.3. [Sb(HAcpNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (3)

Orange solid. Yield: 59%. Anal. Calcd. C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>SbCl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> (681.10): C, 40.56; H, 2.66; N, 14.40. Found: C, 40.51; H, 2.62; N, 14.31%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DMF): 27.97  $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . IR (KBr, Csl/nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1686s,  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$  1523s,  $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$

1523s,  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  1257s,  $\rho(\text{py})$  679w,  $\nu(\text{M} - \text{N})$  517w,  $\nu(\text{M} - \text{O})$  385m,  $\nu(\text{M} - \text{Npy})$  254m,  $\nu(\text{M} - \text{Cl})$  200w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.57 (1H, d,  $J_{\text{H}} = 7.55 \text{ Hz}$ , H(3)), 8.70 (1H, t,  $J_{\text{H}} = 7.27 \text{ Hz}$ , H(4)), 8.41 (2H, m, H(10)), 8.41 (2H, m, H(11)), 2.92 (6H, s, H(15)), 11.70 (1H, s, N(3)H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 146.54, C7=N; 142.46, C4; 131.00, C10; 131.89, C11.

##### 4.2.4. [Bi(HAcPh)Cl<sub>2</sub>] (4)

Yellow solid. Yield: 63%. Anal. Calcd. C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>BiCl<sub>2</sub>N<sub>5</sub> (678.4093): C, 40.72; H, 2.97; N, 10.32. Found: C, 40.49; H, 2.84; N, 10.38%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DMF): 10.31  $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . IR (KBr, Csl/nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1645s,  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$  1515m,  $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$  1487s,  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  1274s,  $\rho(\text{py})$  670w,  $\nu(\text{M} - \text{N})$  469w,  $\nu(\text{M} - \text{O})$  357m,  $\nu(\text{M} - \text{Npy})$  252m,  $\nu(\text{M} - \text{Cl})$  193w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.43 (1H, d,  $J_{\text{H}} = 7.32 \text{ Hz}$ , H(3)), 8.61 (1H, t,  $J_{\text{H}} = 7.86 \text{ Hz}$ , H(4)), 8.24 (2H, m, H(10)), 7.60 (2H, m, H(11)), 2.83 (6H, s, H(15)), 12.36 (1H, s, N(3)H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 151.12, C7=N; 142.74, C4; 128.53, C10; 128.96, C11; 15.05, C15.

##### 4.2.5. [Bi(HAcPcIPh)Cl<sub>2</sub>] (5)

Yellow solid. Yield: 73%. Anal. Calcd. C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>BiCl<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (747.2127): C, 36.97; H, 2.43; N, 9.37. Found: C, 36.97; H, 2.39; N, 9.10%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DMF): 9.07  $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . IR (KBr, Csl/nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1645s,  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$  1520m,  $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$  1485s,  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  1270s,  $\rho(\text{py})$  676w,  $\nu(\text{M} - \text{N})$  489w,  $\nu(\text{M} - \text{O})$  335m,  $\nu(\text{M} - \text{Npy})$  256m,  $\nu(\text{M} - \text{Cl})$  202w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.41 (1H, d,  $J_{\text{H}} = 8.02 \text{ Hz}$ , H(3)), 8.59 (1H, t,  $J_{\text{H}} = 7.45 \text{ Hz}$ , H(4)), 8.20 (2H, d,  $J_{\text{H}} = 7.54 \text{ Hz}$ , H(10)), 7.61 (2H, m, H(11)), 2.81 (6H, s, H(15)), 12.44 (1H, s, N(3)H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 151.15, C7=N; 142.74, C4; 128.66, C10; 130.82, C11; 15.03, C15.

##### 4.2.6. [Bi(HAcPNO<sub>2</sub>Ph)Cl<sub>2</sub>] (6)

Yellow solid. Yield: 67%. Anal. Calcd. C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>BiCl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> (768.3184): C, 35.95; H, 2.36; N, 12.76. Found: C, 36.10; H, 2.34; N, 11.96%. Molar conductivity ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DMF): 15.99  $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ . IR (KBr, Csl/nujol,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1670s,  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{imi}})$  1523s,  $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N}_{\text{py}})$  1523s,  $\nu(\text{N}-\text{H} + \text{C}=\text{N})$  1267s,  $\rho(\text{py})$  679w,  $\nu(\text{M} - \text{N})$  519w,  $\nu(\text{M} - \text{O})$  362m,  $\nu(\text{M} - \text{Npy})$  254m,  $\nu(\text{M} - \text{Cl})$  204w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.48 (1H, d,  $J_{\text{H}} = 8.81 \text{ Hz}$ , H(3)), 8.48 (1H, m, H(4)), 8.36 (2H, d,  $J_{\text{H}} = 8.59 \text{ Hz}$ , H(10)), 8.36 (2H, m, H(11)), 2.81 (6H, s, H(15)), 11.25 (1H, s, N(3)H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 148.81, C7=N; 142.22, C4; 130.18, C10; 130.18, C11; 14.63, C15.

#### 4.3. X-ray crystallography

As already mentioned, crystals of [Sb(AcpClPh)Cl] (**2a**) and [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)(DMSO)Cl] (**6a**) were obtained from slow evaporation of **2** and **6**, respectively, in 1:9 DMSO/acetone. The crystal structures of **2a** and **6a** were determined by using single-crystal X-ray diffractometry.

A summary of the crystals data, data collection details and refinement results is listed in Table 4. Molecular graphics and packing figures were prepared using ORTEP [41].

#### 4.4. Antimicrobial activity

Antibacterial activity was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) using the macrodilution test [42]. *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC19433 and

**Table 4**  
Crystal data and structure refinement for [Sb(AcpClPh)<sub>2</sub>Cl] (**2a**) and [Bi(AcpNO<sub>2</sub>Ph)(DMSO)Cl] (**6a**).

Identification code	( <b>2a</b> )	( <b>6a</b> )
Empirical formula	C <sub>23</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> Sb	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> BiClN <sub>7</sub> O <sub>7</sub> S
Formula weight (g mol <sup>-1</sup> )	623.52	809.99
Color	Orange	Orange
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	0.36 × 0.18 × 0.4	0.36 × 0.29 × 0.13
Temperature (K)	293(2)	293(2)
Wavelength, λ (Å)	0.71073	0.71073
Intervalo de θ (°)	1.90–25.00	2.75–26.37
Limiting indices	-1 ≤ h ≤ 14, -1 ≤ k ≤ 19, -15 ≤ l ≤ 14	-11 ≤ h ≤ 10, -16 ≤ k ≤ 16, -30 ≤ l ≤ 31
Space group	P2(1)/c	P21/n
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Unit cell dimensions		
	a (Å)	8.88910(10)
	b (Å)	13.4044(2)
	c (Å)	24.9236(3)
	α (°)	90
	β (°)	92.4410(10)
	γ (°)	90
Volume (Å <sup>3</sup> )	2405.7(15)	2967.03(7)
Z	4	4
F(000)	1232	1576
Calculated density (Mg m <sup>-3</sup> )	1.722	1.813
Absorption coefficient μ (mm <sup>-1</sup> )	1.512	6.158
Reflections collected	15243	36175
Reflections unique/R(int)	7024/0.0000	6064/0.0505
Restraints/parameters	0/308	0/381
R [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0653, wR2 = 0.1680	R1 = 0.0204, wR2 = 0.0460
R (all)	R1 = 0.1096, wR2 = 0.1991	R1 = 0.0288, wR2 = 0.0471
S	1.022	0.954
Δρ min/max (e Å <sup>-3</sup> )	-0.868/1.482	-0.641/0.718

*P. aeruginosa* ATCC 27853, stored in Mueller Hilton broth were subcultured for testing in the same medium and grown at 37 °C. Then the bacterial cells were suspended, according to the McFarland protocol [43], in saline solution, to produce a suspension of about 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> (colony-forming units per mL). Serial dilutions of the test compounds, previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), were prepared in test tubes to final concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, and 1 μg mL<sup>-1</sup>; 100 μL of a 24 h old inoculum was added to each tube. The MIC, defined as the lowest concentration of the test compound, which inhibits the visible growth after 20 h, was determined visually after incubation for 20 h at 37 °C. Tests using tetracycline and ciprofloxacin as references and DMSO as negative control were carried out in parallel. All tests were performed in triplicate with full agreement between results.

Antifungal activity was also evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) using the macrodilution test [41]. *C. albicans* ATCC 10231, stored in Sabouraud broth, was subcultured for testing in the same medium and grown at 37 °C. Then the yeast cells were suspended, according to the McFarland protocol [44], in saline solution, to produce a suspension of about 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Serial dilutions of the test compounds, previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), were prepared in test tubes to final concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.3 and 0.1 μg mL<sup>-1</sup>. 100 μL of a 24 h old inoculum was added to each tube. The MIC was determined visually after incubation for 20 h at 37 °C. DMSO was used as negative control. Tests using fluconazole as reference and DMSO as negative control were carried out in parallel. All tests were performed in triplicate.

#### 4.5. Cytotoxicity activity

##### 4.5.1. Materials

Cisplatin, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT), RPMI-1460, L-glutamine were purchased from Sigma, and Antibiotic/Antimicotic Solution and fetal calf serum were purchased from Gibco (Grand Island, NY).

##### 4.5.2. Cell lines

Jurkat (human immortalized line of T lymphocyte), HL60 (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<sup>-1</sup> penicillin and 100 μg mL<sup>-1</sup> streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mM of L-glutamine and 10% of fetal bovine serum. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

##### 4.5.3. 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 HL60 and MCF-7 cells were inoculated at 50,000 and 40,000 cells 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% CO<sub>2</sub> and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.1% DMSO (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 dimethyl sulfoxide (DMSO) prior to dilution. Compounds that inhibited the proliferation in more than 50% were selected for determination of the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). IC<sub>50</sub> values were determined over a range of concentrations (100–0.01 μM). All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

##### 4.5.4. 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.

[45]. In brief, PBMC samples were obtained through agreement with Minas Gerais Hematology and Hemotherapy Center Foundation – HEMOMINAS (protocol no 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  $2.5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . 100  $\mu\text{L}$  of this suspension (250,000 cells) were added to a 96-wells plate and incubated for 24 h in the presence of 2.5  $\text{mg mL}^{-1}$  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  $\mu\text{M}$ ) for 48 h, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . 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/antimycotic solution containing 1000 U  $\text{mL}^{-1}$  penicillin, 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin and 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  fungisone (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) was added to control fungal and bacterial contamination.

All experiments were performed in triplicate using cisplatin as the positive control. We conducted a solvent control (DMSO) at the same concentration of the tested samples (less than 0.5%). Proliferation and viability were evaluated by the MTT assay.

#### 4.5.5. *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 [46]. Briefly, after 4 h of the end of incubation of cells with different compounds, 20  $\mu\text{L}$  of MTT solution (2.5  $\text{mg mL}^{-1}$  in phosphate-buffered saline) were added to each well, the supernatant was removed and 200  $\mu\text{L}$  of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 570 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, comparing with 0.1% DMSO control and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD treated – mean OD background)/(mean OD untreated cultured, i.e. 0.1% DMSO – mean OD blank wells)  $\times$  100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative [47].

#### 4.5.6. DNA fragmentation assay

Subdiploid 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 proapoptotic potential of compounds. Subdiploid DNA content was evaluated in HL60, Jurkat, MCF-7 and HCT-116 cells subjected to different treatments with selected compounds, according to the method described by Nicoletti et al. [48]. For this study, 100,000 cells in suspension treated or not with compounds were centrifuged for 5 min at 200 g, 4 °C. After centrifugation, cells were resuspended in hypotonic fluorochrome solution-HFS [50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  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 subdiploid phase. The subdiploid DNA content was determined by the CellQuest program (Becton Dickinson).

#### 4.5.7. Statistical analyses

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  $\pm$  SEM. Significance was tested by the Student's *t*-test.

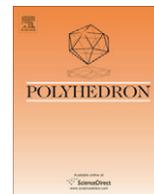
#### Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq, INCT-INOFAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6), and FAPEMIG for financial support.

#### References

- [1] P.J. Sadler, H. Li, H. Sun, Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth, *Coord. Chem. Rev.* 185–186 (1999) 689–709.
- [2] E.R.T. Tiekink, Antimony and bismuth compounds in oncology, *Crit. Rev. Onc. Hemat.* 42 (2002) 217–224.
- [3] C. Silvestru, C. Socaciu, A. Bara, I. Haiduc, The first organoantimony(III) compounds possessing antitumor properties: diphenylantimony(III) derivatives of dithiophosphorus ligands, *Anticancer Res.* 10 (1990) 803–804.
- [4] S. Wyllie, A.H. Fairlamb, Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 257–267.
- [5] 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.
- [6] N.C. Kasuga, K. Onodera, S. Nakano, K. Hayashi, K. Nomiya, Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of 6-coordinate antimony(III) complexes with tridentate 2-acetylpyridine thiosemicarbazone, bis(thiosemicarbazone) and semicarbazone ligands, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1176–1186.
- [7] D.J. Berman, Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies, *Rev. Infect. Dis.* 10 (1988) 560–586.
- [8] C.B.M. Tester-Dalderup, Antiprotozoal drugs, in: M.N.G. Dukes (Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs*, thirteenth ed. Elsevier, Amsterdam, 1996, pp. 799–842.
- [9] M.B. Lee, H.M. Gilbert, Current approaches to leishmaniasis, *Infect. Med.* 16 (1999) 37–45.
- [10] 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.
- [11] I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, N(4)-tolyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant antifungal activity. Crystal structure of N(4)-para-tolyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazone, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1571–1577.
- [12] B. Bottari, R. Maccari, F. Monforte, R. Ottanà, M.G. Vigorita, G. Bruno, F. Nicolò, A. Rotondo, E. Rotondo, Nickel(II) 2,6-diacetylpyridine bis(isonicotinoylhydrazonate) and bis(benzoylhydrazonate) complexes: structure and antimicrobial evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 2203–2211.
- [13] N. Bharti, M.R. Maurya, F. Naqvi, A. Bhattacharya, S. Bhattacharya, A. Azam, Palladium(II) complexes of NS donor ligands derived from 5-methyl-dithiocarbamate, S-benzylthiocarbamate and thiosemicarbazide as antiamebic agents, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 481–486.
- [14] P.B. Sreeja, A. Sreeranth, C.R. Nayar, M.R.P. Kurup, A. Usman, I.A. Razak, S. Chantapromma, H.K. Fun, Synthesis, spectral studies and structure of 2-hydroxyacetophenone nicotinic acid hydrazone, *J. Mol. Struct.* 645 (2003) 221–225.
- [15] E. Viñuelas-Zahinos, M.A. Maldonado-Rogado, F. Luna-Giles, F.J. Barros-García, Coordination behaviour of Schiff base 2-acetyl-2-thiazoline hydrazone (ATH) towards cobalt(II), nickel(II) and copper(II), *Polyhedron* 27 (2008) 879–886.
- [16] P. Vicini, F. Zani, P. Cozzini, I. Doytchinova, Hydrazone of 1,2-benzisothiazole hydrazides: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 553–564.
- [17] B. Kocyigit-Kaymakcioglu, S. Rollas, Synthesis, characterization and evaluation of antituberculosis activity of some hydrazones, *Farmacologia* 57 (2002) 595–599.
- [18] J.V. Ragavendran, D. Sriram, S.K. Patel, I.V. Reddy, N. Bharathwajan, J. Stables, P. Yogeewari, Design and synthesis of anticonvulsants from a combined phthalimide-GABA – anilide and hydrazone pharmacophore, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 146–151.

- [19] H.J.C. Bezerra-Netto, D.I. Lacerda, A.L.P. Miranda, H.M. Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Design and synthesis of 3,4-methylenedioxy-6-nitrophenoxylhydrazone derivatives obtained from natural saffrole: new lead-agents with analgesic and antipyretic properties, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (2006) 7924–7935.
- [20] S. Rollas, S.G. Küçükgül, Biological activities of hydrazone derivatives, *Molecules* 12 (2007) 1910–1939.
- [21] J.D. Ranford, J.J. Vittal, Y.M. Wang, Dicopper(II) complexes of the antitumor analogues *acylbis*(salicylaldehyde hydrazones) and crystal structures of monomeric [Cu(2)(1,3-propanedioyl bis(salicylaldehyde hydrazone))(H<sub>2</sub>O)(2)], (ClO<sub>4</sub>)(2), 3H<sub>2</sub>O and polymeric {[Cu(2)(1,6-hexanedioylbis(salicylaldehydehydrazone))(C(2)H(5)OH)(2)(m)(l)) (ClO<sub>4</sub>)(2)(m)(l).m(C(2)H(5)OH)}, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 1226–1231.
- [22] J.L. Buss, B.T. Greene, J. Turner, F.M. Torti, S.V. Torti, Iron chelators in cancer chemotherapy, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1623–1635.
- [23] M. Whitnall, R. Richardson, Iron: a new target for pharmacological intervention in neurodegenerative diseases, *Sem. Ped. Neurol.* 13 (2006) 186–197.
- [24] P.S. Donnelly, A. Caragounis, T. Du, K.M. Laughton, I. Volitakis, R.A. Cherny, R.A. Sharples, A.F. Hill, Q.-X. Li, C.L. Masters, K.J. Barnham, A.R. White, Selective intracellular release of copper and zinc ions from bis(thiosemicarbazonato) complexes reduces levels of Alzheimer disease amyloid- $\beta$  peptide, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 4568–4577.
- [25] K.B. Gudasi, S.A. Patil, R.S. Vadavi, R.V. Shenoy, M. Nethaji, S.W.A. Bligh, Synthesis and spectral investigation of manganese(II), cadmium(II) and oxovanadium(IV) complexes with 2,6-diacetylpyridine bis(2-aminobenzoylhydrazone): crystal structure of manganese(II) and cadmium(II) complexes, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 3229–3236.
- [26] A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-methyl hydrazone, *J. Mol. Struct.* 920 (2009) 97–102.
- [27] A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Structural studies on zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-derived hydrazones, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 2117–2122.
- [28] A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Do Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Copper(II) and zinc(II) complexes with 2-formylpyridine-derived hydrazones, *Polyhedron* 28 (2009) 3797–3803.
- [29] A.A. Recio Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, Organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine benzoylhydrazones: antimicrobial activity, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247–1257.
- [30] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, second ed. Wiley-Interscience, New York, 1970, p. 291.
- [31] K. Nomiya, K. Sekino, M. Ishikawa, A. Honda, M. Yokoyama, N.C. Kasuga, H. Yokoyama, S. Nakano, K. Onodera, Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of monomeric 8-coordinate, and dimeric and monomeric 7-coordinate bismuth(III) complexes with tridentate and pentadentate thiosemicarbazones and pentadentate semicarbazone ligands, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 601–615.
- [32] P.V. Bernhardt, G.J. Wilson, P.C. Sharpe, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 107–119.
- [33] M.R. Bermejo, R. Pedrido, A.M. González-Noya, M.J. Romero, M. Vázquez, L. Sorace, Conformational rearrangement of 2,6-bis-(1-salicyloylhydrazonoethyl)pyridine (H4daps) on complexation. Synthesis and X-ray characterization of H4daps and its copper helicate complex [Cu(H<sub>2</sub>daps)(H<sub>2</sub>O)]<sub>2</sub> · 2CH<sub>3</sub>CN, *New J. Chem.* 27 (2003) 1753–1759.
- [34] J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D.N. Deobagkar, C.E. Anson, A. Powell, Structural chemistry and in vitro antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 51–55.
- [35] L. Zhang, J. Yu, B.H. Park, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents, *Science* 290 (2000) 989–992.
- [36] VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org> (2005).
- [37] M. Carcelli, P. Mazza, C. Pelizzi, G. Pelizzi, F. Zani, Antimicrobial and genotoxic activity of 2,6-diacetylpyridine bis(acylhydrazones) and their complexes with some first transition series metal ions. X-ray crystal structure of a dinuclear copper(II) complex, *J. Inorg. Biochem.* 57 (1995) 43–62.
- [38] T. Benson, T.R. Cundari, L.C. Saunders, S.O. Sommerer, Synthesis, structure, computational studies and magnetic properties of a ten-coordinate gadolinium(III) complex, *Inorg. Chim. Acta* 258 (1997) 127–130.
- [39] CRYALISPRO, Oxford Diffraction Ltd., Version 1.171.34.34 (release 05-01-2010 CrysAlis171.NET).
- [40] G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Cryst. A* 64 (2008) 112–122.
- [41] L.J. Farrugia, ORTEP-3 for windows – a version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI), *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 565–566.
- [42] J. Pernak, J. Rogoza, I. Mirska, Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 313–320.
- [43] National Committee for Clinical Laboratory Standards, Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Document M7–A6, NCCLS, Pennsylvania, USA, 2003, ISBN 1-56238-486-4.
- [44] National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Document M27eMA2 NCCLS, NCCLS, Pennsylvania, USA, 2002, ISBN 1-56238-469-4.
- [45] G. Gazzinelli, N. Katz, R.S. Rocha, D.G. Colley, Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis, *J. Immunol.* 130 (1983) 2891–2895.
- [46] T.J. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [47] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E. Wood, Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay, *J. Exp. Chem.* 50 (2004) 43–50.
- [48] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271–279.



## *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and platinum(II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells

Karina O.S. Ferraz<sup>a</sup>, Gabriele M.M. Cardoso<sup>b</sup>, Caryne Margotto Bertollo<sup>b</sup>, Elaine M. Souza-Fagundes<sup>b</sup>, Nivaldo Speziali<sup>c</sup>, Carlos L. Zani<sup>d</sup>, Isolda C. Mendes<sup>a</sup>, Maria A. Gomes<sup>e</sup>, Heloisa Beraldo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Pesquisas Rene Rachou, Fiocruz, Av Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 August 2010

Accepted 26 October 2010

Available online 31 October 2010

#### Keywords:

Thiosemicarbazones

Platinum(II) complexes

Solid tumor

### ABSTRACT

Complexes [Pt(2Bz4oT)Cl], [Pt(2Bz4mT)Cl], and [Pt(2Bz4pT)Cl] were prepared with *N*(4)-*ortho*-(H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT), and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones. The thiosemicarbazones exhibited moderate anti-proliferative activity against HepG2 (hepatoma) and UACC-62 (melanoma) cancer cell lines, but showed high anti-proliferative effect against A431 (epithelial carcinoma) cancer cell lines. Upon coordination to platinum(II) the anti-proliferative activity decreases in all cases. The cytotoxicity of the previously prepared palladium(II) analogues [Pd(2Bz4oT)Cl], [Pd(2Bz4mT)Cl], and [Pd(2Bz4pT)Cl] was also investigated. As in the case of the platinum(II) complexes, coordination to palladium(II) did not lead to activity improvement. Investigations on the mechanism of cytotoxic action against A431 cells revealed that [Pd(2Bz4oT)Cl] induced DNA fragmentation and apoptosis while H2Bz4oT did not present this effect. The high anti-proliferative effect of the thiosemicarbazones and [Pd(2Bz4oT)Cl] against A431 cells, together with the pro-apoptotic effect of [Pd(2Bz4oT)Cl] suggests that these compounds have potential as chemotherapeutic drug candidates.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The antitumoral properties of *cis*[diamminedichloroplatinum(II)], cisplatin, are now well documented. Cisplatin is used to treat both solid and disseminated tumors and has been shown to be effective against virally-induced, chemically-induced and transplantable tumors [1]. Cisplatin shows a great synergy with many other chemotherapeutic drugs and is widely employed in the treatment of testicular, ovarian and breast cancer. However, the toxic side effects associated with cisplatin, which are particularly severe at the level of renal function, represent a major drawback in its therapeutic employment [1]. Moreover, the clinical utility of cisplatin and the second generation platinum drugs is limited to a relatively narrow range of tumors, because of primary resistance and the development of resistance secondary to the initial treatment [2].

Hence unconventional platinum(II) complexes with different organic ligands were designed as a strategy to overcome resistance to cisplatin and its analogs [3]. Also, palladium(II) complexes with

a variety of ligands were obtained and assayed against human tumor cell lines and cisplatin-resistant tumor cell lines [4,5].

Thiosemicarbazones and their metal complexes are very promising compounds which present a wide range of pharmacological applications as antimicrobial, antiparasital, antitumoral and antiviral agents [6]. In many circumstances the pharmacological activity of thiosemicarbazones increases upon coordination to metal ions [6–9].

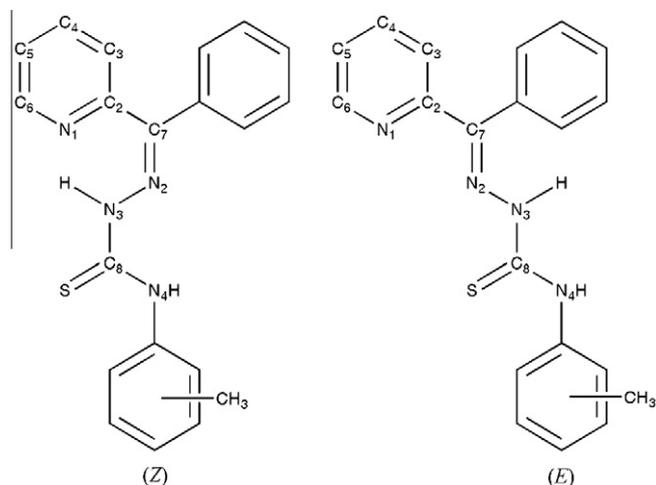
It has been shown that palladium(II) and platinum(II) complexes with thiosemicarbazones are active against cisplatin-resistant human cancer cell lines, probably because their mode of action involves inter-strand crosslinks with DNA, while intra-strand crosslinks is the major coordination mode of cisplatin [10,11].

We demonstrated that 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and tin(IV) complexes present cytotoxic activity against MCF-7, TK-10 and UACC-62 human tumor cell lines and are able to induce cell death by apoptosis [12,13].

Our recent investigation on *N*(4)-tolyl-thiosemicarbazones revealed that upon coordination of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived *N*(4)-tolyl-thiosemicarbazones to copper(II) the

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3499 5740; fax: +55 31 3499 5700.

E-mail address: [hberaldo@ufmg.br](mailto:hberaldo@ufmg.br) (H. Beraldo).



**Fig. 1.** General structure of the configurational isomers of 2-benzoylpyridine *N*(4)-*ortho*-, (H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT), and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolylthiosemicarbazones.

antimicrobial activity significantly increases [7,8]. We also demonstrated that *N*(4)-*ortho*-(H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT) and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolylthiosemicarbazones derived from 2-benzoylpyridine are highly cytotoxic against Jurkat, HL60 and the resistant HL60.Bcl-X<sub>L</sub> leukemia cell lines at nanomolar concentrations, but much less cytotoxic to HepG2 human hepatoma cells [14].

In the present work H2Bz4oT, H2Bz4mT, and H2Bz4pT (see Fig. 1) and their platinum(II) complexes have been evaluated for their *in vitro* anti-proliferative activity against HepG2 (hepatoma), UACC-62 (melanoma) and A431 (epithelial carcinoma) human cancer cell lines. For comparison purposes we also assayed the cytotoxicity of the palladium(II) complexes with the same ligands against the same cell lineages.

The human epidermoid carcinoma cell line A431 is derived from a human squamous carcinoma and expresses abnormally high levels of the epidermal growth factor receptor (EGFR) [15]. EGFR signaling inhibition represents a highly promising arena for the application of molecularly targeted cancer therapies, specially as an important molecular target in epithelial malignancies [16].

UACC-62 is a human cancer cell line recommended by the National Cancer Institute (NCI, USA) in screening studies for detection of anti-proliferative compounds.

HepG2 cells present hepatocyte specific cell functions and were chosen as a model of cytotoxicity of xenobiotics. Several studies suggest that these cells have retained many characteristics of adult hepatocytes, and therefore are a good tool to predict potential toxicity (mutagenicity and carcinogenicity) of compounds [17–20].

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and instrumentation

Partial elemental analyses were performed on a Perkin–Elmer CHN 2400 analyzer. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using CsI pellets; an YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements; NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) spectrometer using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*<sub>6</sub>) as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference. Splitting patterns are designated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet.

### 2.2. Synthesis

#### 2.2.1. Syntheses of *N*(4)-*ortho*-(H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT), and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazones

H2Bz4oT (**1**), H2Bz4mT (**2**), and H2Bz4pT (**3**) were prepared according to previously reported procedures [7,8].

#### 2.2.2. Synthesis of platinum(II) and palladium(II) complexes with *N*(4)-*ortho*-(H2Bz4oT), *N*(4)-*meta*-(H2Bz4mT) and *N*(4)-*para*-(H2Bz4pT) tolyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazones

The platinum(II) complexes were prepared by mixing the desired ligand in ethanol with an aqueous solution of K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> in equimolar amounts (1 mmol). The reaction mixture was kept under reflux for 2 h. The solids which precipitate were filtered off and washed with ethanol and ether, and dried.

The synthesis of the palladium(II) complexes with the same ligands have been reported previously [14].

2.2.2.1. [Pt(2Bz4oT)Cl] (**4**). Maroon solid. Yield: 63%. *Anal. Calc.* for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>PtS (575.97): C, 41.71; H, 2.97; N, 9.73. Found: C, 41.50; H, 2.71; N, 9.86%. Molar conductivity (1 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> DMF): 1.0 Ω<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>. IR (KBr, CsI/Nujol, cm<sup>-1</sup>): ν(C=N) 1615m, ν(C=S) 777w, ρ(py) 701w, ν(M–N) 380w, ν(M–S) 343m, ν(M–N<sub>py</sub>) 257m, ν(M–Cl) 303w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.87 (1H, d, H(6)), 7.71 (1H, d, H(5)), 8.05 (1H, t, H(4)), 7.22 (1H, d, H(3)), 9.92 (1H, s, N(4)H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 169.51, C8=S; 142.86, C7=N; 147.60, C6; 126.66, C5; 141.64, C4; 127.61, C3; 158.13, C2.

2.2.2.2. [Pt(2Bz4mT)Cl] (**5**). Brown solid. Yield: 94%. *Anal. Calc.* for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>PtS (575.97): C, 41.71; H, 2.97; N, 9.73. Found: C, 41.39; H, 3.03; N, 9.78%. Molar conductivity (1 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> DMF): 16 Ω<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>. IR (KBr, CsI/Nujol, cm<sup>-1</sup>): ν(C=N) 1595m, ν(C=S) 781m, ρ(py) 642w, ν(M–N) 384w, ν(M–S) 350m, ν(M–N<sub>py</sub>) 278m, ν(M–Cl) 302w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.92 (1H, d, H(6)), 7.77 (1H, H(5)), 8.10 (1H, t, H(4)), 7.60 (1H, d, H(3)), 10.29 (1H, s, N(4)H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 178.25, C8=S; 158.06, C7=N; 146.77, C6; 127.10, C5; 140.72, C4; 127.19, C3; 159.12, C2.

2.2.2.3. [Pt(2Bz4pT)Cl] (**6**). Brown solid. Yield: 68%. *Anal. Calc.* for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>PtS (575.97): C, 41.71; H, 2.97; N, 9.73. Found: C, 41.54; H, 3.01; N, 9.58%. Molar conductivity (1 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> DMF): 14.5 Ω<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>. IR (KBr, CsI/Nujol, cm<sup>-1</sup>): ν(C=N) 1603m, ν(C=S) 753w, ρ(py) 682w, ν(M–N) 384w, ν(M–S) 350w, ν(M–N<sub>py</sub>) 280m, ν(M–Cl) 304w. The main signals in <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.88 (1H, d, H(6)), 7.72 (1H, t, H(5)), 8.07 (1H, t, H(4)), 7.37 (1H, d, H(3)), 9.93 (1H, s, N(4)H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 179.68, C8=S; 141.68, C7=N; 149.26, C6; 126.64, C5; 141.56, C4; 127.58, C3; 160.55, C2.

### 2.3. X-ray crystallography

Crystals suitable for X-ray diffraction were obtained from slow evaporation of 4 in 1:9 DMSO/acetone. Crystal of [Pt(2Bz4oT)Cl]·DMSO (**4a**) was mounted on a glass fiber and used for data collection. X-ray diffraction data collection was performed on a Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri) using graphite-Enhance Source Mo Kα radiation (λ = 0.71069 Å) at 293(2) K. Data integration and scaling of the reflections were performed with the CRYSLIS suite [21]. Final unit cell parameters were based on the fitting of all reflections positions. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [22] and refined by full-matrix least-squares techniques against F<sup>2</sup> using SHELXL-97 [23].

Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non hydrogen atoms. The solvation DMSO in

**Table 1**  
Crystal data and structure refinement for [Pt(2Bz4oT)Cl]·DMSO (**4a**).

Identification code	( <b>4a</b> )
Empirical formula	PtC <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> SClC <sub>2</sub> OS
Formula weight	654.10
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 <sub>1</sub> /c
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	11.8140(4)
<i>b</i> (Å)	16.6548(3)
<i>c</i> (Å)	13.2376(4)
$\beta$ (°)	114.803(4)
Volume (Å <sup>3</sup> )	2364.36(12)
<i>Z</i>	4
<i>D</i> <sub>calc</sub> (mg/m <sup>3</sup> )	1.838
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	6.246
<i>F</i> (0 0 0)	1272
$\theta$ Range for data collection	2.98–26.37
Limiting indices (°)	–13 ≤ <i>h</i> ≤ 14 –20 ≤ <i>k</i> ≤ 18 –16 ≤ <i>l</i> ≤ 16
Reflections collected/unique	12246/4834 ( <i>R</i> <sub>int</sub> = 0.0315)
Completeness to $\theta = 26.37^\circ$	99.9%
Data/restraints/parameters	3378/0/291
Goodness-of-fit on <i>F</i> <sup>2</sup>	0.808
Final <i>R</i> indices [ <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0230, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0318
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0433, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0333
Largest difference in peak and hole (e Å <sup>-3</sup> )	0.602 and –0.799

the crystal was disordered. A twofold DMSO disorder model was refined resulting in the ratio of 61.5/38.5. The hydrogen atoms were located in difference maps and included as fixed contributions riding on attached atoms. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of rms shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Molecular graphics were obtained from ORTEP [24]. A summary of the crystal data, experimental details and refinement results are listed in Table 1.

#### 2.4. *In vitro* cytotoxicity studies (assays with human cancer cell lines)

##### 2.4.1. Materials

Cisplatin, methylthiazolotetrazolium (MTT), RPMI-1460, and L-glutamine were purchased from Sigma Chemicals. Antibiotic/antimicrobial solution was purchased from GIBCO BRL, Grand Island, NY.

##### 2.4.2. Cell lines

Human liver tumor cells, HepG2, and A431, were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Human melanoma cell line UACC-62, was obtained from the NCI anticancer cell line panel of the National Cancer Institute–Division of Cancer Treatment and Diagnosis repository, National Cancer Institute, Frederick, MD. All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO BRL, Grand Island, NY); 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) and fungizone. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The media were changed twice weekly and they are regularly examined.

##### 2.4.3. Anti-proliferative assay

For the cytotoxicity evaluation, HepG2 were detached from the culture flasks by addition 1 mL of 0.05% trypsin–EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY). After counting, dilutions were made to give appropriate cell densities for inoculating onto the microtiter plates. Cells were inoculated in a volume of 100 µL/well at densities of 40 000 cells.

UACC-62 and A431 cells were inoculated at 10 000 cells of per well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells prior to the addition of the test compounds. Freshly prepared solutions of the different substances were tested at 50 µM. Subsequently, the plates were incubated for 48 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.1% DMSO (negative control) and 50 µM of cisplatin (positive control). Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), prior to dilution. All compounds were tested in triplicate.

##### 2.4.4. *In vitro* cell viability assay – MTT assay

The MTT assay is a standard colorimetric assay, which measures reduction of MTT to formazan by mitochondrial dehydrogenases in living cells, with production of a purple color [25]. The yellow tetrazolium salt (MTT) is reduced in metabolically active cells to form insoluble purple formazan crystals, which are solubilized by the addition of a solvent. The color can then be quantified by spectrophotometric means. The samples are read using an ELISA plate reader at a wavelength of 570 nm. The amount of purple color produced is directly proportional to the number of viable cells.

Briefly, for the final 4 h of incubation 20 µL of MTT solution (5 mg/mL in phosphate-buffered saline) were added to each well. At the end of the incubation period the supernatant was removed and 200 µL of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystal.

The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 570 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, comparing with 0.1% DMSO control and were calculated as follows: cell proliferation (%) = (mean OD treated – mean OD background)/mean OD untreated cultured, i.e. 0.1% DMSO – mean OD blank wells) × 100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative [26].

##### 2.4.5. DNA fragmentation assay

Cell cycle status and quantification of DNA fragmentation (hypodiploid DNA-content) was performed by propidium iodide (PI) staining according to Nicolletti and colleagues [27]. Cells were treated with the four compounds (50 µM) in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air-humidified atmosphere at 37 °C for 24 h. After drug incubation, the cells were centrifuged and resuspended in hypotonic fluorochrome solution – HFS (50 µg/mL propidium iodide – PI in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100). The samples in HFS were incubated at 4 °C during 4 h and immediately taken to flow cytometer. The PI fluorescence of 20 000 individual nuclei was measured using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California). Data analysis was performed with FLOWJO software (TreeStar Inc., CA, USA).

##### 2.4.6. Statistical analysis

All experiments were performed at least three replicates per compound and results shown are the average of three independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. Significance was tested by Student's *t*-test.

#### 2.5. Studies of interactions with supercoiled plasmid DNA

Agarose gel electrophoresis, was carried out to identify the modifications resulting from the DNA-complexes interaction. Thus,

200 ng of purified pGEM<sup>®</sup>-T plasmid DNA (Promega-USA) were incubated with compounds (**1**, **4**, and **7**) at the same concentration (75  $\mu\text{M}$ ) in Tris-HCl buffer (NaCl 50 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.2). The mixture was incubated at 37 °C for 24 h [28]. Thereafter, the reactions were quenched by adding 5  $\mu\text{L}$  of a loading buffer solution (50 mmol L<sup>-1</sup> Tris, pH 7.2, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol, and 250 mmol L<sup>-1</sup> EDTA). The samples were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis in 0.5X TBE buffer for 1 h at 75 mV. The gel was stained after electrophoresis in 0.5X TBE buffer with 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ethidium bromide for 15 min and visualized by UV light.

### 3. Results and discussion

Microanalyses and molar conductivity data suggest the formation of [Pt(L)Cl] complexes with all thiosemicarbazones.

The  $\nu(\text{C}=\text{N})$  stretching vibration of the thiosemicarbazones at 1583–1594  $\text{cm}^{-1}$  in the infrared spectra shifts to 1595–1615  $\text{cm}^{-1}$  in the complexes, indicating coordination of the imine nitrogen [7–9,12–14]. The absorption at 846–849  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the free bases, attributed to the  $\nu(\text{C}=\text{S})$  vibration, shifts to 753–781  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the complexes, indicating coordination through a thiolate sulfur [7–9,12–14]. Absorptions at 257–280, 380–384, 343–350, and 302–304  $\text{cm}^{-1}$  in the spectra of the complexes were attributed to the  $\nu(\text{Pt}-\text{Npy})$ ,  $\nu(\text{Pt}-\text{N})$ ,  $\nu(\text{Pt}-\text{S})$ , and  $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$  vibrations, respectively [29]. Hence the infrared spectra indicate coordination through the N–N–S chelating system. A chloride ion occupies the fourth coordination site.

The NMR spectra of the thiosemicarbazones and their platinum(II) complexes were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub> because this is the only solvent which dissolves all ligands and complexes. The <sup>1</sup>H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortion less enhancement by polarization transfer (DEPT135) experiments.

The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

All <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C signals of the thiosemicarbazones are duplicated, according to the existence of the *Z* and *E* configurational isomers in solution. In the first N3–H is hydrogen-bonded to the pyridine nitrogen, while in the latter N3–H is hydrogen-bonded to the solvent [7–9,12–14]. Only one signal was observed for all hydrogens and carbons in the spectra of the complexes. The signal of N3–H is absent in the spectra of **4–6**, according to deprotonation and formation of an anionic ligand. Upon coordination the signals of the pyridine hydrogens as well as those of N4–H undergo significant shifts, suggesting coordination of the pyridine nitrogen and of the sulfur [7–9,12–14]. Variations occur in the <sup>13</sup>C NMR spectra for the signals of C8–S, C7–N and the pyridine carbons, in accordance with coordination of the sulfur, the imine nitrogen and the hetero-aromatic nitrogen, leading to compounds in which the thiosemicarbazone adopts the *E* configuration in relation to the C7–N2 bond [7–9,12–14].

#### 3.1. X-ray crystallography

In the [Pt(2Bz4oT)Cl]·DMSO (**4a**) crystals the metal coordination number is four and the thiosemicarbazone adopts the *EZ* conformation in relation to the C7=N2 and C8=N3 bonds (see Fig. 2).

The thiosemicarbazone is attached to the metal centre through the Npy–N–S coordination system and a chloride ion occupies the fourth coordination position.

The crystal structure of the palladium analogue of complex (**4a**), [Pd(Bz4oT)Cl]·DMSO, has been previously determined by some of us [14]. Selected bond distances and angles in both structures are reported in Table 2 for the sake of comparison.

The C8–S bond distance is 1.753(4) Å in **4a**, which is closer to the observed values for C–S single bonds [12–14]. In the free thiosemicarbazone this bond has a predominantly double bond

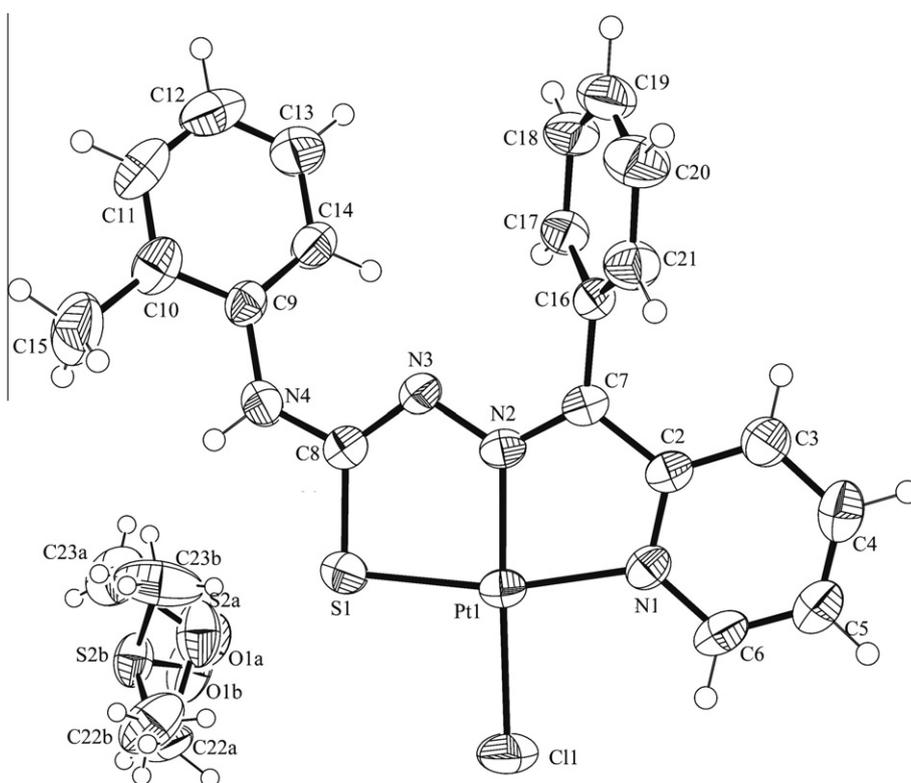


Fig. 2. Molecular plot of [Pt(2Bz4oT)Cl]·DMSO (**4a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

**Table 2**Selected bonds distances (Å) and angles (°) for [Pt(2Bz4oT)Cl]·DMSO (**4a**) and [Pd(2Bz4oT)Cl]·DMSO.

Atoms	[Pt(2Bz4oT)Cl]·DMSO ( <b>4a</b> )	[Pd(2Bz4oT)Cl]·DMSO
<i>Distances (Å)</i>		
M–N2	1.945(2)	1.952(3)
M–N1	2.046(2)	2.069(4)
M–S1	2.2461(8)	2.242(1)
M–Cl1	2.2963(9)	2.290(1)
S1–C8	1.753(3)	1.751(4)
C2–C7	1.463(4)	1.469(6)
N2–C7	1.314(4)	1.307(5)
N2–N3	1.381(3)	1.379(5)
N3–C8	1.315(4)	1.317(5)
N4–C8	1.353(4)	1.355(6)
N4–C9	1.425(4)	1.439(6)
<i>Angles (°)</i>		
N1–C2–C7	115.8(3)	115.6(4)
N2–C7–C2	113.8(3)	115.1(4)
C7–N2–N3	119.2(3)	119.5(4)
N2–N3–C8	111.6(3)	111.1(4)
N4–C8–N3	118.2(3)	118.3(4)
C8–N4–C9	127.1(3)	126.8(4)
N3–C8–S1	125.7(2)	125.9(3)
N2–M–N1	80.73(10)	81.0(1)
N1–M–S1	166.14(8)	166.1(1)
N2–M–S1	85.41(8)	85.1(1)
N1–M–Cl1	97.28(8)	97.9(1)
N2–M–Cl1	177.08(8)	177.4(1)
S1–M–Cl1	96.57(3)	96.03(5)

character. Upon coordination deprotonation at N3 occurs, with formation of a highly delocalized system involving the thiosemicarbazone chain and the aromatic ring, and C–S acquires a predominantly single bond character.

As expected, most bond distances and angles in the thiosemicarbazones chain are similar in the two complexes. Even the metal bond distances, such as M–N, M–S, and M–Cl are alike. This is due to the small difference in the radius of platinum(II) and palladium(II) in square-planar coordination compounds – Pt(II) = 0.74 Å and Pd(II) = 0.78 Å [30].

### 3.2. Cytotoxic activity against human tumor cells

The anti-proliferative activities of the free thiosemicarbazones (**1–3**) and their complexes (**4–6**) were assayed on HepG2 human hepatoma, UACC-62 melanoma and A431 human epithelial carcinoma cells. Fig. 3 shows the percentage of cell proliferation in the presence of the thiosemicarbazones and their platinum(II) complexes (**4–6**), along with data for the palladium(II) analogues

[Pd(2Bz4oT)Cl] (**7**), [Pd(2Bz4mT)Cl] (**8**), and [Pd(2Bz4pT)Cl] (**9**). The cytotoxic activity of the thiosemicarbazones and complexes (**7–9**) was previously studied against leukemia cells and against HepG2 cells [14], but their activity against UACC62 and A431 solid tumor cell lines is reported for the first time in the present paper.

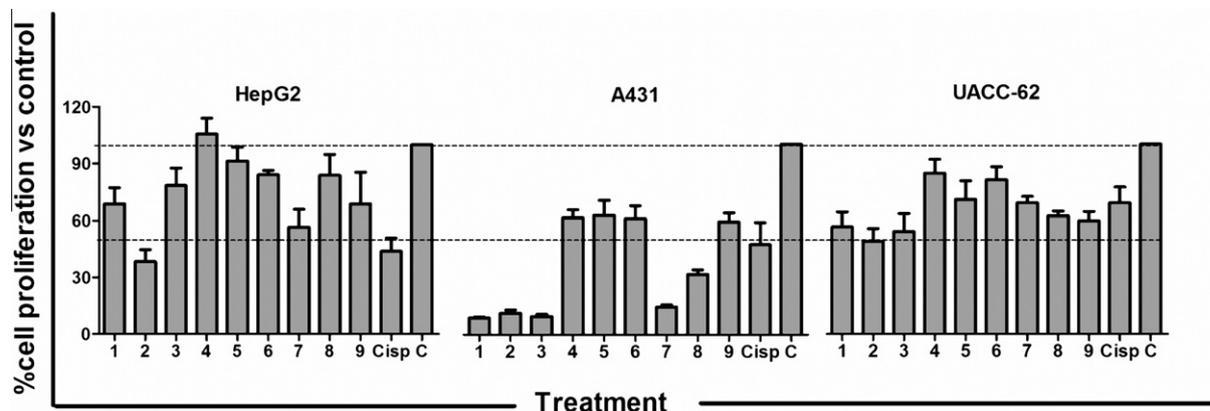
The anti-proliferative effect of the compounds was evaluated by measuring the levels of cell proliferation after incubation of cells with the test samples, using the MTT colorimetric assay, which evaluates the capacity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase of viable cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals. The results are expressed as percentage of cell proliferation compared with cell control (cell treated with vehicle, DMSO 0.1%) (Fig. 3). Cisplatin, a reference drug currently used on clinic, was assayed as positive control.

Cell type-specific susceptibility differences could be observed after incubation with the different compounds. The proliferation inhibition of HepG2 and UACC-62 cells by the thiosemicarbazones at the maximum concentration of 50 µM was 15–60%, while inhibition of A431 cells' growth was 90%. Cisplatin inhibited 50% of A431 cells' proliferation at the same concentration. The anti-proliferative activity of the three thiosemicarbazones against UACC-62 cells was comparable, suggesting that the position of the tolyl group does not have influence on cytotoxicity. Similarly, the position of the tolyl group did not influence cytotoxicity against A 431 cells. In contrast the *meta*-tolyl derivative exerted higher anti-proliferative effect against HepG2 cells than its *ortho* and *para*-tolyl analogues.

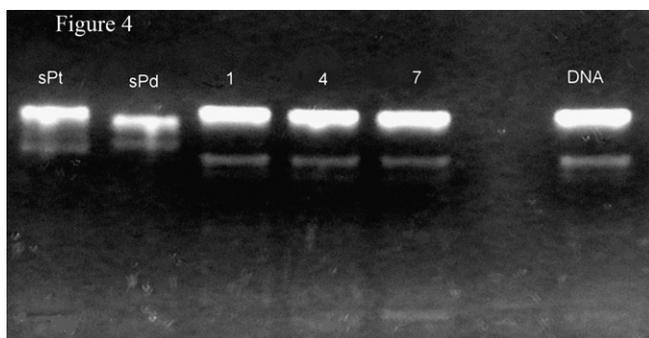
All platinum(II) complexes exerted lower anti-proliferative activity than the free thiosemicarbazones against all cell lineages. Similarly, the palladium(II) complexes exerted comparable or lower activity than the parent thiosemicarbazones against all cell lineages, but were more cytotoxic than the platinum(II) analogues. No significant differences were observed in cytotoxicity against all cell lineages among complexes **4–6**. Complex **7** exerted higher cytotoxic effect against HepG2 cells and all complexes **7–9** exerted similar effect against UACC-62 cells. Interestingly, the order of cytotoxicity against A431 cells was **7** > **8** > **9**. Cytotoxicity of complex **7** was similar to that of cisplatin.

In a previous work we demonstrated that this same family of thiosemicarbazones is highly cytotoxic against leukemia cells and that upon coordination to palladium(II) activity decreases, like in the present case [14].

Other groups reported an effect of increased cytotoxic activity upon coordination of thiosemicarbazones to palladium(II) [10,11]. However, in this case bidentate thiosemicarbazones were employed, which lead to the formation of complexes with two



**Fig. 3.** Cytotoxic effect of thiosemicarbazones **1–3** and complexes **4–9** on HepG2, A431, and UACC-62 cell lines. Cells were treated with compounds (50 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 DMSO 0.1%). Representative data of at least three independent experiments performed in triplicate.



**Fig. 4.** Agarose gel electrophoresis of pGEM<sup>®</sup>-T plasmid DNA treated with compounds **1**, **4**, **7**, K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (sPt), and K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (sPd) (75 μM) in Tris–HCl buffer (NaCl 50 mM, Tris–HCl 5 mM, pH 7.2) incubated at 37 °C for 24 h.

chlorides in the metal coordination sphere, which could be released in order for the metal to bind to DNA forming inter-strand crosslinks.

Like in the case of leukemia cells [14] we may suggest that the lower activity of the platinum(II) and palladium(II) complexes as compared to the activity of the free thiosemicarbazones against the three solid tumor cell lines is probably due to the presence of a tridentate ligand together with only one labile chloride in the metal coordination sphere to be released allowing the metal to bind to DNA.

### 3.3. Studies of interactions with supercoiled plasmid DNA

The effect of **4** and **7** on DNA conformation was evaluated by the electrophoretic mobility of the plasmid pGEM-T after association with the complexes. At the employed concentration (75 μM) the compounds did not alter the electrophoretic mobility of DNA (Fig. 4). Ligand **1** did not modify the electrophoretic mobility of DNA as well.

Hence our investigation on the interaction of **1**, **4**, and **7** with DNA revealed either that these compounds do not interact with the DNA bases or that interaction, if it occurs, does not lead to stable adducts at 75 μM. Interestingly, both starting salts interacted with DNA in the employed conditions.

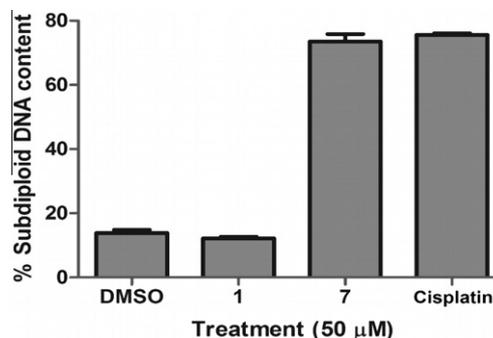
Since palladium(II) complexes are more labile than their platinum(II) congeners, release of the chloride from the metal coordination sphere occurs more easily in the first case. The higher cytotoxicity of the palladium(II) complexes suggests that release of the chloride is probably involved in the mechanism of action of these complexes.

Since the complexes present cytotoxic activity (but are less cytotoxic than the corresponding ligands), we decided to further investigate their mechanism of action. The mode of action of **1–3** probably occurs through inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase, the proposed mechanism of action of α(N)-heterocyclic thiosemicarbazones [31–34].

### 3.4. Studies of DNA fragmentation

To determine if the observed cytotoxic effects of ligands and complexes were associated with other cell death mechanisms, we evaluated the potential of these compounds to induce cell death by apoptosis. We chose to investigate this effect in A431 cells because this line was the most susceptible to both ligands and complexes. Hence, we measured the percentage of subdiploid DNA content in A431 cells in the presence of H2Bz4oT (ligand **1**) and complex (**7**), the most cytotoxic compounds in this lineage.

We used the method described by Nicoletti and colleagues (1991) [27], which is based on the principle that the apoptotic



**Fig. 5.** DNA fragmentation induced by ligand (**1**) and complex (**7**) in A431 cells. A431 cells were incubated with 50 μM of each compound, at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h. DNA content was assessed by flow-cytometric analysis of cells labeled with propidium iodide. Each data represents SEM ± SD from two different experiments (\**P* < 0.05, Student's *t*-test).

cells, among other typical features, are characterized by DNA fragmentation and, consequently, loss of nuclear DNA content. Apoptotic nuclei appear as a broad hypodiploid DNA peak which is easily discriminable from the narrow peak of cells with normal (diploid) DNA content. This new rapid, simple and reproducible method is useful for assessing apoptosis of specific cell populations.

Our results (Fig. 5) clearly demonstrate that complex (**7**), but not its free thiosemicarbazone (**1**), induced an increase of subdiploid DNA content (DNA fragmentation) in A431 cells when compared with vehicle (DMSO, 0.05%). Cisplatin was used as positive control since it shows pro-apoptotic activity against several cancer lineages.

These results suggested that the coordination of H2Bz4oT to palladium(II) altered the thiosemicarbazone's activity. In fact, although ligand **1** did not show a pro-apoptotic effect, its complex (**7**) presented pro-apoptotic activity. Although the screening MTT experiment to quantify viability of A431 cells demonstrated similar effects for **1** and **7**, analysis of DNA fragmentation clearly showed that only **7** possesses pro-apoptotic activity.

Different cytotoxicity assays can give different results depending on the test agent used and the cytotoxicity assay employed [35]. In this context, the DNA content analysis revealed different profiles for **1** and **7** while the MTT assay indicated similar behavior for both compounds. This can be attributed to the fact that MTT evaluated the energetic function of mitochondria that is preserved during the course of apoptosis. When the damage level of mitochondria is mild or moderate, mitochondria can still generate sufficient energy for initiation and execution of the apoptotic process [36].

The increase of subdiploid DNA content (DNA fragmentation) observed in A431 cells after treatment with **7** suggested that this complex activates the apoptosis pathway. Thus although **1** and **7** presented a similar behavior in the electrophoresis assay, the more sensitive DNA fragmentation assay showed completely distinct behaviors for **1** and **7**.

## 4. Conclusions

Our data demonstrate that the thiosemicarbazones and their platinum(II) complexes inhibit the hepatoblastoma HepG2 cell line proliferation at concentrations greater than 50 μM (Fig. 3). The same is true for the previously studied palladium(II) complexes. *In vitro* cytotoxicity assays have been recommended to predict target-organ toxicity of a chemical *in vivo* [20]. HepG2 cells have targeted many characteristics of adult hepatocytes, and are therefore a good tool to predict potential toxicity of compounds [17–20]. Our results indicate that the thiosemicarbazones and their

platinum(II) and palladium(II) complexes have hepatotoxic profiles similar to that of cisplatin.

The tumoral lineage A431, that expresses great levels of epidermal growth factor receptor (EGFR), has been used as a model to screen compounds useful in the discovery of new anticancer agents. Our results suggest that compounds **1–3** and **7** are highly cytotoxic against A431 cells. Complex **7**, in addition, is able to induce cell death by apoptosis. Hence **1–3** and **7** could be useful to treat squamous cell head and neck cancer, the seventh most common cause of cancer death worldwide whose incidence is rising rapidly in developing countries [37,38].

The significant cytotoxic effect of **1–3** and **7** against epithelial carcinoma A431 cell lines together with their hepatotoxic profile similar to that of cisplatin, indicate that further studies on this class of compounds should be of considerable interest.

## Acknowledgements

We thank Fapemig, CNPq and INCT-INOVAR/CNPq.

## Appendix A. Supplementary data

CCDC 780813 contains the supplementary crystallographic data for **4a**. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

## References

- [1] L. Dalla Via, V. Di Noto, M. Vidali, F. Scmazzone, D. Ni, R. Deana, *Chem.-Biol. Interact.* 110 (1998) 203.
- [2] E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2451.
- [3] A.S. Abu-Surrah, *Mini-Rev. Med. Chem.* 7 (2007) 203.
- [4] A.S. Abu-Surrah, H.H. Al-Sa'doni, M.Y. Abdalla, *Cancer Therapy* 6 (2008) 1.
- [5] D. Kovala-Demertzi, A. Boccarelli, M.A. Demertzi, M. Coluccia, *Chemotherapy* 53 (2007) 148.
- [6] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31.
- [7] I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashi, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1571.
- [8] I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, *Polyhedron* 26 (2007) 3263.
- [9] J.G. Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2301.
- [10] A.G. Quiroga, J.M. Pérez, E.I. Montero, J.R. Masaguer, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998) 117.
- [11] A. Gómez Quiroga, C. Navarro-Ranninger, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 119.
- [12] 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.
- [13] A.P. Rebolledo, 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.
- [14] 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-Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7138.
- [15] N.K. Sah, A. Munshi, M. Hobbs, B.Z. Carter, M. Andreeff, R.E. Meyn, *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 66 (2006) 852.
- [16] P.M. Harari, G.W. Allen, J.A. Bonner, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 4057.
- [17] L. Zhang, X. Mu, J. Fu, Z. Zhou, *Toxicol. in Vitro* 21 (2007) 734.
- [18] M.J. Gomez-Lechon, J.V. Castell, M.T. Donato, *Chem. Biol. Interact.* 168 (2007) 30.
- [19] M. Dubois, H. Plaisance, J. Thome, P. Kremers, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34 (1996) 205.
- [20] M. Bohl, J. Bohl, B. Schwenzer, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 54 (2006) 62.
- [21] CRYSLIS RED, Oxford Diffraction Ltd., v 1.171.32.38.
- [22] G.M. Sheldrick, T.R. Schneider, *Methods Enzymol.* 277 (1997) 319.
- [23] G.M., Sheldrick, *SHELXL-97*, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [24] L.J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 565.
- [25] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55.
- [26] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood, *Exp. Chem.* 50 (2004) 43.
- [27] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271.
- [28] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [29] J.L. Neto, G.M. de Lima, H. Beraldo, *Spectrochim. Acta A* 63 (2006) 669.
- [30] R.D. Shannon, *Acta Crystallogr., Sect. A* 32 (1976) 751.
- [31] 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.
- [32] R.A. Finch, M.C. Liu, A.H. Cory, J.G. Cory, A.C. Sartorelli, *Adv. Enzyme Regulat.* 39 (1999) 3.
- [33] I. Gojo, M.L. Tidwell, J. Greer, N. Takebe, K. Seiter, M.F. Pochron, B. Johnson, M. Sznol, J.E. Karp, *Leuk. Res.* 31 (2007) 1165.
- [34] L.R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 665.
- [35] G. Fotakis, J.A. Timbrell, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 171.
- [36] Y. Wei-ping, H. Bo-hua, S. Jian-he, Z. Suo-qiang, D. Henderson, *Chin. Med. J.* 123 (2010) 1633.
- [37] I.K. Dev, R.E. Dornsife, T.M. Hopper, J.A. Onori, C.G. Miller, L.E. Harrington, K.M. Dold, R.J. Mullin, J.H. Johnson, R.M. Crosby, A.T. Truesdale, A.H. Epperly, K.W. Hinkle, M. Cheung, J.A. Stafford, D.K. Luttrell, R. Kumar, *Br. J. Cancer* 91 (2004) 1066.
- [38] M. Sattler, O. Abidoye, R. Salgia, *Sci. World J.* 8 (2008) 909.