

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Camila Vargas Garcia Maia

**Complexos de rênio(I) e cobalto(III) como candidatos a
metalofármacos antitumorais**

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/DQ. 1.211^a

T. 543^a

Camila Vargas Garcia Maia

**Complexos de rênio(I) e cobalto(III) como candidatos a
metalofármacos antitumorais**

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

Belo Horizonte

2017

M217c
2017
T
Maia, Camila Vargas Garcia
Complexos de rênio(I) e cobalto(III) como
candidatos a metalofármacos antitumorais [manuscrito]
/ Camila Vargas Garcia Maia. 2017.
[xvi], 120 + [17] f.: il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

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

1. Química inorgânica - Teses 2. Complexos
metálicos de transição - Teses 3. Schiff, Bases de -
Teses 4. Fármacos - Teses 5. Agentes antineoplásicos -
Teses 6. Cobalto - Teses 7. Rênio - Teses 8. Compostos
organometálicos - Teses I. Beraldo, Heloisa de
Oliveira, Orientadora II. Título.

CDU 043

**"Complexos de Rênio(I) e Cobalto(III) como Candidatos a Metalofármacos
Antitumorais"**

Camila Vargas Garcia Maia

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG

Maribel Navarro

Prof. Maribel Coromoto Navarro Acosta
UFJF

Alzir Azevedo Batista

Prof. Alzir Azevedo Batista
UFSCAR

Ynara Marina Demori

Profa. Ynara Marina Demori
UFMG

Cynthia Peres Demicheli

Profa. Cynthia Peres Demicheli
UFMG

Belo Horizonte, 27 de março de 2017.

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

Dedico este trabalho a todos os amigos e familiares que me apoiaram durante minha formação acadêmica. Em especial, dedico o trabalho aos meus pais Vanderlei e Ilma, meu irmão Fernando e meu marido Paulo Henrique.

Agradecimentos

À Prof^ª. Heloisa pela confiança, orientação e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) pelo apoio financeiro.

Aos departamento de Química da UFMG e Simon Fraser University (SFU) pela infraestrutura fornecida.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG e aos técnicos de laboratório pela disposição e suporte durante todo o doutorado.

Aos professores e colegas do departamento de Química pelos ensinamentos e amizade.

Aos pesquisadores Dr. Bernardo L. Rodrigues (UFMG), Dr^ª. Jacqueline Takahashi (UFMG), Dr. Paulo Jorge S. Barbeira (UFMG), Dr^ª. Elaine M. S. Fagundes (UFMG) e Dr. Adilson K. Ferreira (USP) pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Tim Storr pela oportunidade e colaboração no trabalho realizado na SFU – Canadá.

Aos professores Dr. Gilson F. Silva, Dr. Rubén D. S. Millan e Dr^ª. Maria Helena de Araújo pelos ensinamentos e correções realizadas no trabalho de Qualificação.

Aos alunos do grupo da Prof^ª. Heloisa Beraldo, Angel, Jeferson, Gabrieli, Lucas, Ligiane, Lenka, Ane Francielly, Ana Paula, Elisa e Mariana, pelo trabalho em equipe e aprendizados.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Storr, Dustin, Jessica, Tiffany e Chaofeng, pela colaboração ao longo do de meu estágio sanduíche e, em especial, ao aluno de doutorado Ryan pela realização dos experimentos de raio X.

Aos colegas brasileiros, Vinicius, Jack, Lígia, André e Fabíola, por fazerem minha estadia em Vancouver mais agradável.

Aos queridos amigos de trabalho e da vida, Alexandre, Lucius, Luciana, Luiza, Khrystyna e Chen, pelo apoio e ensinamentos ao longo do doutorado. Obrigada pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros, Maria e Marcos, pelo carinho, atenção e por terem me acolhido em seu lar.

Ao meu marido Paulo Henrique pelo amor, paciência e compreensão. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado!

Aos meus queridos pais (Ilma e Vanderlei) e meu irmão Fernando pelo apoio, amor e ensinamentos. Obrigada também por compreenderem os seis meses que fiquei longe de vocês.

Para finalizar, agradeço a Deus que sempre me deu força nos momentos de ansiedade e estresse.

Resumo

Complexos de rênio(I) e cobalto(III) como candidatos a metalofármacos antitumorais

O presente estudo consistiu na investigação de complexos de rênio(I) e cobalto(III) com bases de Schiff com atividade antiproliferativa visando o desenvolvimento de novos candidatos a metalofármacos antitumorais.

Complexos de rênio(I) têm sido pouco investigados quanto às suas aplicações como agentes citotóxicos. No presente trabalho foram obtidos os complexos $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcPh})]$ (**1**), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{Ac}p\text{ClPh})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (**2**) e $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (**3**) com 2-acetilpiridina-fenilhidrazona (H_2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenilhidrazona ($\text{H}_2\text{Ac}p\text{ClPh}$) e 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenilhidrazona ($\text{H}_2\text{Ac}p\text{NO}_2\text{Ph}$).

Os complexos (**1-3**) apresentaram atividade antiproliferativa frente a células de carcinoma pulmonar humano NCI-H460, sendo que o melhor resultado foi obtido para **3**. Além disso, os complexos foram mais ativos do que as hidrazonas livres. Os complexos **1-3** também apresentaram citotoxicidade frente a células não tumorais HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana), sugerindo que poderiam apresentar atividade anti-angiogênica. **2** e **3** induziram apoptose com subsequente ruptura mitocondrial em células NCI-H460 e exibiram alta atividade antioxidante (redução da produção de espécies reativas de oxigênio) de maneira dose-dependente. Os complexos não foram ativos contra diferentes espécies de fungos do gênero *Candida* e contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas.

Estes resultados se mostram promissores do ponto de vista do desenvolvimento de novos metalofármacos antitumorais, tornando relevante a investigação de complexos análogos de $^{186,188}\text{Re}$ como potenciais metaloradiofármacos.

Complexos de cobalto(III) com ligantes antineoplásicos têm sido utilizados como pró-drogas biorredutíveis para serem seletivamente ativadas em regiões de hipóxia. Sendo assim, foram obtidos os complexos $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{ClPh})_2]\text{Cl} \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (**6**) com H_2AcPh , $\text{H}_2\text{Ac}p\text{ClPh}$ e $\text{H}_2\text{Ac}p\text{NO}_2\text{Ph}$, assim como $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl} \cdot \text{CH}_3\text{OH} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**7**), $[\text{Co}(\text{2Ac4}p\text{ClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**), $[\text{Co}(\text{2Ac4}o\text{ClPh})_2]\text{Cl} \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**9**), $[\text{Co}(\text{2Ac4}p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) e $[\text{Co}(\text{2Ac4}o\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**), com 2-acetilpiridina-*N*(4)-feniltiossemicarbazona ($\text{H}_2\text{Ac4Ph}$), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-clorofeniltiossemicarbazona ($\text{H}_2\text{Ac4}p\text{ClPh}$), 2-

acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*CIPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*p*NO₂Ph) e 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*NO₂Ph).

Estudos eletroquímicos mostraram que os complexos de cobalto(III) com hidrazonas (4-6) possuem potenciais de redução mais favoráveis do que complexos análogos com tiossemicarbazonas (7-11). Os valores de potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) obtidos para os complexos (4-6) encontram-se na faixa de redutores celulares. Além disso, observou-se que o processo de redução Co^{III}/Co^{II} ocorre via mecanismo quasi-reversível. Estudos de redução, acompanhados por espectroscopia eletrônica e espectrometria de massas, mostraram que o complexo (4) seria reduzido na presença de 3 equivalentes molares de ditionito de sódio (Na₂S₂O₄) com subsequente liberação do ligante H2AcPh. Por outro lado, a redução do complexo análogo com tiossemicarbazona (7) não foi observada na presença de 3 ou 10 equivalentes molares de Na₂S₂O₄ em um período de 24 horas.

Considerando-se que nos complexos de cobalto(III) há dois ligantes por átomo de cobalto, verificou-se que, de modo geral, as hidrazonas e tiossemicarbazonas se mostraram mais ativas do que seus complexos frente a células leucêmicas (HL60, Jurkat e THP-1) e de tumores sólidos (MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116). Os melhores resultados foram observados para os complexos (7) e (8), que se mostraram consideravelmente menos ativos do que os ligantes H2Ac4Ph e H2Ac4*p*CIPh frente a células de tumores sólidos. Além disso, esses compostos apresentaram baixa citotoxicidade frente a células não tumorais Vero (rim de macaco verde). No entanto, não foi observada diferença na atividade dos complexos (4-5 e 7-8) quando testados frente células MCF-7 cultivadas nos modelos monocamada (2D) e tridimensional *soft-agar* (3D).

Apesar de os complexos (4-5) não apresentarem seletividade frente células MCF-7 cultivadas no modelo 3D, as propriedades citotóxicas e o comportamento eletroquímico dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas os tornam potencialmente adequados para serem utilizados como pró-drogas biorredutíveis. Dessa forma, a investigação citotóxica desses compostos frente a diferentes linhagens celulares de tumores sólidos e em câmara de hipóxia se torna uma estratégia interessante.

Considerando-se a relevância de se conhecer outras bioatividades de potenciais candidatos a fármacos antineoplásicos, foi realizado um estudo do efeito antimicrobiano dos complexos de cobalto(III). De modo geral, os complexos com tiossemicarbazonas mostraram-se mais ativos do que os complexos com hidrazonas frente a bactérias *Gram*-positivas. Os complexos de hidrazonas mostraram ação antifúngica frente a fungos do gênero *Candida*.

Tanto os complexos de rênio(I) quanto os de cobalto(III) mostraram-se capazes de suprimir a fluorescência exibida pela albumina sérica humana (ASH) através da formação de um complexo na proporção 1:1 (complexo metálico – ASH). As interações ocorrem por meio de um mecanismo estático, sugerindo que os complexos poderiam ser transportados por essa proteína que possui diversas funções fisiológicas no organismo.

Desse modo, a coordenação de rênio(I) e cobalto(III) a ligantes citotóxicos da classe das bases de Schiff, tais como hidrazonas e tiossemicarbazonas, revelaram-se estratégias interessantes para o planejamento de novos candidatos a metalofármacos antitumorais. O presente trabalho constitui importante contribuição à Química Medicinal Inorgânica.

Palavras-chave: bases de Schiff, metalofármacos, atividade citotóxica, hipóxia.

Abstract

Rhenium(I) and cobalt(III) complexes as antitumor metallopharmaceuticals candidates

The present study involved the investigation of rhenium(I) and cobalt(III) complexes containing Schiff bases with antiproliferative activity for the development of new antitumor metallopharmaceuticals candidates.

Rhenium(I) complexes have not been investigated extensively for their applications as cytotoxic agents. In the present work the complexes $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})]$ (**1**), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2Ac}p\text{ClPh})] \cdot 0.5\text{C}_7\text{H}_8$ (**2**) and $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})] \cdot 0.5\text{C}_7\text{H}_8$ (**3**) were obtained with 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (H2AcPh), 2-acetylpyridine-*para*-chlorophenylhydrazone (H2Ac p ClPh) and 2-acetylpyridine-*para*-nitrophenylhydrazone (H2Ac p NO₂Ph).

Complexes (**1-3**) showed antiproliferative activity against NCI-H460 human lung carcinoma cells, with **3** showing the best result. Moreover, the complexes were more active than the free hydrazones. Complexes **1-3** also presented cytotoxicity against non-malignant HUVECs (human umbilical vein endothelial) cells, suggesting that they could also have antiangiogenic activity. **2** and **3** induced apoptosis with subsequent mitochondrial disruption on NCI-H460 cells and showed a dose-dependent high antioxidant activity (reduction on reactive oxygen species production). The complexes were not active against different species of *Candida* genus' fungi and *Gram*-positive and *Gram*-negative bacteria.

These results are promising from the point of view of development of new antitumor metallopharmaceuticals making relevant the investigation of ^{186,188}Re analog complexes as potential metalloradiopharmaceuticals.

Cobalt(III) complexes with antineoplastic ligands have been used as bioreductive prodrugs to be selectively activated at hypoxia regions. Therefore, complexes $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{ClPh})_2]\text{Cl} \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**5**) and $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (**6**) were obtained with H2AcPh, H2Ac p ClPh and H2Ac p NO₂Ph, as well as $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot \text{CH}_3\text{OH} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**7**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4p\text{ClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**8**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4o\text{ClPh})_2]\text{Cl} \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**9**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) and $[\text{Co}(\text{2Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**) with 2-acetylpyridine-*N*(4)-phenylthiosemicarbazone (H2Ac4Ph), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*para*-

chlorophenylthiosemicarbazone (H2Ac4*p*ClPh), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-
chlorophenylthiosemicarbazone (H2Ac4*o*ClPh), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*para*-
nitrophenylthiosemicarbazone (H2Ac4*p*NO₂Ph) and 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-
nitrophenylthiosemicarbazone (H2Ac4*o*NO₂Ph).

Electrochemical studies showed that cobalt(III) complexes with hydrazones (**4-6**) have a more favorable reduction potential than the analogs with thiosemicarbazones (**7-11**). The half-wave potential values ($E_{1/2}$) obtained for complexes (**4-6**) are within the cellular reductants range. Furthermore, it was observed that the Co^{III}/Co^{II} reduction process happens by a quasi-reversible mechanism. Reduction studies, accompanied by electronic spectroscopy and mass spectrometry, showed that complex (**4**) was reduced in the presence of 3 mol equivalents of sodium dithionite (Na₂S₂O₄) with subsequent H2AcPh ligand release. On the other hand, the reduction of the analogue complex with thiosemicarbazone (**7**) was not observed in the presence of 3 or 10 mol equivalents of Na₂S₂O₄ in a 24-hours period.

Considering that the cobalt(III) complexes have two ligands per cobalt atom, it was verified that, in general, the hydrazones and thiosemicarbazones showed to be more active than their complexes against HL60, Jurkat and THP-1 leukemia and MCF-7, MDA-MB-231 and HCT-116 solid tumor cells. The best results were observed for complexes (**7**) and (**8**) which proved to be considerably less active than the H2Ac4Ph and H2Ac4*p*ClPh ligands against the solid tumors cells. In addition, these compounds presented low cytotoxicity against Vero (green monkey kidney) non-malignant cells. However, no difference in the activity was observed for complexes (**4-5** and **7-8**) against MCF-7 cells when the cells were cultured in monolayer (2D) or in the three-dimensional *soft-agar* (3D) models.

Although complexes (**4-5**) do not show selectivity against MCF-7 cells cultured in the 3D model, the cytotoxic properties and the electrochemical behavior of cobalt(III) complexes with hydrazones make them potentially suitable to be used as bio-reducible pro-drugs. In this way, the investigation of the cytotoxic effects of these compounds against other solid tumor cell lines in hypoxia chamber is of utmost relevance.

Considering the need to understand the other bioactivities of potential antineoplastic drug candidates, an evaluation of the antimicrobial effects of the cobalt(III) complexes under study was carried out. Overall the complexes with thiosemicarbazones showed higher activity against *Gram*-positive bacteria than those with hydrazones. The hydrazone complexes showed antifungal activity against *Candida* genus' fungi.

Both rhenium(I) and cobalt(III) complexes were able to suppress human serum albumin (HSA) fluorescence with formation of a 1:1 metal complex-HSA system. The

interaction occurs by means of a static mechanism, suggesting that the complexes could be transported by this protein which has several physiological functions in the organism.

Thus, coordination of rhenium(I) and cobalt(III) to cytotoxic Schiff base ligands, such as hydrazones and thiosemicarbazones, revealed to be an interesting strategy for the planning of new antitumor metallopharmaceutical candidates. The present work constitutes an important contribution to Inorganic Medicinal Chemistry.

Keywords: Schiff bases, metallopharmaceuticals, cytotoxic activity, hypoxia.

Sumário

Capítulo 1 Introdução.....	1
1.1 Química Medicinal Inorgânica.....	1
1.2 Fármacos e metalofármacos biorredutíveis para o tratamento do câncer.....	3
1.3 Complexos de cobalto(III) como candidatos a metalofármacos antitumorais: estratégia de redução do cobalto(III) a cobalto(II) para vetorizar o ligante para o tumor em condições de hipóxia.....	8
1.4 Complexos de rênio(I) como candidatos a metalofármacos e radiometalofármacos antitumorais.....	10
1.5 Radiofármacos para o tratamento do câncer.....	13
1.6 Bases de Schiff e suas aplicações na Química Medicinal: ligantes para candidatos a metalofármacos antitumorais.....	15
1.6.1 <i>Hidrazonas</i>	16
1.6.2 <i>Tiossemicarbazonas</i>	18
1.7 Objetivos do presente trabalho.....	21
Capítulo 2 Materiais e Métodos.....	23
2.1 Materiais, equipamentos e procedimentos.....	23
2.1.1 <i>Reagentes e solventes</i>	23
2.1.2 <i>Medidas de massa</i>	23
2.1.3 <i>Temperatura de fusão</i>	23
2.1.4 <i>Análise elementar de CHN</i>	23
2.1.5 <i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	23
2.1.6 <i>Análise condutimétrica</i>	23
2.1.7 <i>Medidas de susceptibilidade magnética</i>	24
2.1.8 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)</i>	24
2.1.9 <i>Espectroscopia eletrônica</i>	24
2.1.10 <i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	24
2.1.11 <i>Estudos eletroquímicos</i>	25
2.1.12 <i>Difração de raios X</i>	25
2.1.13 <i>Espectrometria de massas de alta resolução</i>	26
2.1.14 <i>Determinação do pH</i>	26
2.1.15 <i>Estabilidade dos compostos pH</i>	26
2.2 Sínteses de ligantes e complexos.....	26

2.2.1 Sínteses de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina.....	26
2.2.2 Sínteses de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina.....	27
2.2.3 Sínteses dos complexos de rênio(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina.....	28
2.2.4 Sínteses dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina.....	29
2.2.5 Sínteses dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina	29
2.3 Ensaio biológicos.....	30
2.3.1 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de rênio(I).....	30
2.3.1.1 Linhagens celulares e condições de cultura.....	31
2.3.1.2 Avaliação da citotoxicidade.....	31
2.3.1.3 Avaliação de morte celular por Anexina V-FITC / Iodeto de Propídeo.....	31
2.3.1.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	32
2.3.1.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	32
2.3.1.6 Análises estatísticas.....	32
2.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de cobalto(III)	33
2.3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura.....	33
2.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade.....	33
2.3.2.3 Teste de viabilidade celular <i>in vitro</i>	34
2.3.2.4 Teste de viabilidade celular em soft-agar (3D).....	34
2.3.3 Testes de atividade antimicrobiana.....	35
2.3.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método da macrodiluição.....	35
2.3.3.2 Avaliação da atividade antifúngica pelo método da microdiluição.....	36
2.3.4 Estudos de interação com albumina sérica humana (ASH).....	37
2.3.5 Estudos de interação com o agente redutor ditionito de sódio (DTN).....	40

Capítulo 3 Complexos de rênio(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina.....

3.1 Caracterização dos compostos.....	41
3.1.1 Análises.....	42
3.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	42
3.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	50
3.1.4 Cristalografia de raios X.....	52
3.2 Avaliação da atividade biológica das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e	

seus complexos de rênio(I)	58
3.2.1 <i>Atividade antimicrobiana</i>	58
3.2.2 <i>Atividade citotóxica</i>	60
3.2.3 <i>Estudos de interação com albumina sérica humana (ASH)</i>	64
Capítulo 4 Complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina	68
4.1 Caracterização dos compostos	68
4.1.1 <i>Caracterização dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas</i>	68
4.1.1.1 <i>Análises</i>	69
4.1.1.2 <i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	70
4.1.1.3 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)</i>	74
4.1.1.4 <i>Cristalografia de raios X</i>	76
4.1.2 <i>Caracterização dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas</i>	80
4.1.2.1 <i>Análises</i>	81
4.1.2.2 <i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	82
4.1.2.3 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)</i>	88
4.1.2.4 <i>Cristalografia de raios X</i>	91
4.2 Estudos eletroquímicos dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas	94
4.3 Estudos de interação dos complexos [Co(2AcPh)₂]Cl·2H₂O (4) e [Co(2Ac4Ph)₂]Cl·CH₃OH·0,5H₂O (7) com o agente redutor ditionito de sódio (DTN)	101
4.4 Complexos de cobalto(III) contendo o ligante auxiliar tetradentado tris(metilpiridil)amina (TPA)	103
4.5 Avaliação da atividade biológica das hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de cobalto(III)	105
4.5.1 <i>Atividade antimicrobiana</i>	105
4.5.2 <i>Atividade citotóxica</i>	108
4.5.3 <i>Estudos de interação com albumina sérica humana (ASH)</i>	112
Capítulo 5 Discussão e Conclusões	115
Anexos: artigos publicados	120

Lista de abreviaturas e símbolos

\uparrow	Símbolo convenção no DEPT 135 para CH e CH ₃
^1H	Isótopo do hidrogênio com 1 unidade de massa atômica
^{13}C	Isótopo do carbono com 13 unidades de massa atômica
$\alpha(N)$	Cadeia lateral no C(2) do anel piridínico
ε	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
ρ	Deformação angular no plano
χ	Susceptibilidade magnética
χ_g	Susceptibilidade magnética por grama
ν	Estiramento axial de ligação
$\Delta m\Psi$	Potencial de membrana mitocondrial
v	Velocidade de varredura de potencial
ΔE_p	Varição de potenciais entre picos catódicos e anódicos
τ_0	Tempo de vida da fluorescência na ausência do agente supressor
Abs	Absorbância
ADN	Ácido desoxirribunucleico
ASH	Albumina sérica humana
ASB	Albumina sérica bovina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBS	<i>College of Biological Sciences</i>
CI ₅₀	Concentração que inibe 50 % da viabilidade celular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
d	Dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DHE	Dihidroetídeo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado

DO	Densidade óptica
DO _{ex} e DO _{em}	Densidades ópticas de excitação e emissão
DP	Desvio padrão
DTN	Ditionito de sódio (Na ₂ S ₂ O ₄)
ENH	Eletrodo Normal de Hidrogênio
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
E_{pa} e E_{pc}	Potenciais de pico anódico e catódico
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
F e F ₀	Intensidades de fluorescência na presença e ausência do agente supressor
F _{obs} e F _{corr}	Intensidades de fluorescência observada e corrigida
Fc	Ferroceno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H2AcPh	2-acetilpiridina-fenilhidrazona
H2Ac _p ClPh	2-acetilpiridina- <i>para</i> -clorofenilhidrazona
H2Ac _p NO ₂ Ph	2-acetilpiridina- <i>para</i> -nitrofenilhidrazona
H2Ac4Ph	2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)-feniltiossemicarbazona
H2Ac4 _p ClPh	2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>para</i> -clorofeniltiossemicarbazona
H2Ac4 _o ClPh	2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>orto</i> -clorofeniltiossemicarbazona
H2Ac4 _p NO ₂ Ph	2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>para</i> -nitrofeniltiossemicarbazona
H2Ac4 _o NO ₂ Ph	2-acetilpiridina- <i>N</i> (4)- <i>orto</i> -nitrofeniltiossemicarbazona
HCT-116	Carcinoma colorretal
HL60	Leucemia mielóide aguda
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HUVECs	Células endoteliais de veia umbilical humana
i_{pa} e i_{pc}	Correntes de picos anódico e catódico
IP	Iodeto de propídeo
Jurkat	Leucemia linfócitos T
K_b	Constante de ligação proteína-agente supressor
K_S	Constante de associação agente supressor/fluoróforo
K_q	Constante de supressão dinâmica ou bimolecular
LMCT	Transferência de carga do ligante para o metal
m	Multiplete
MCF-7	Carcinoma mamário

MH	<i>Mueller Hinton</i>
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MM	Massa molar
m / z	Massa / carga
<i>n</i>	Número de sítios de ligação
[NBu ₄][ClO ₄]	Perclorato de tetrabutílamônio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratorial Standarts</i>
NCI-H460	Carcinoma pulmonar humano
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDAHs	Pró-Drogas Ativadas por Hipóxia
[Q]	Concentração do agente supressor da fluorescência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Simpleto
SFB	Soro Fetal Bovino
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
t	Tripleto
td	Triplo duplete
T _f e T _{dec}	Temperaturas de fusão e decomposição
TG	Análise termogravimétrica
THP-1	Leucemia monocítica
TMRE	Tetrametil Rodamina Metil Éster
TMS	Tetrametilsilano
TPA	<i>tris</i> (2-piridilmetil)amina
Tris	<i>tris</i> (hidroximetil)aminometano
Trp	Triptofano
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta e Visível
Vero	Rim de macaco verde

Lista de Figuras

Figura 1.1 Representação estrutural dos compostos: cisplatina (A), nitroprussiato de sódio (B), auranofina (C), carboplatina (D) e oxaliplatina (E).....	2
Figura 1.2 Classes de agentes biorredutíveis: quinonas (A), nitroimidazóis (B, C), <i>N</i> -óxidos (D) e nitro compostos contendo nitrogênio mostarda (E, F).....	6
Figura 1.3 Complexos de platina(IV) e rutênio(III) como PDAHs. Esquema de redução da mitaplatina (A). Estrutura dos compostos tetraplatina (B), satraplatina (C), iproplatina (D), Nami-A (E) e KP1019 (F).....	7
Figura 1.4 Complexos de cobalto(III) investigados como potenciais PDAH's: [Co(R-acac) ₂ (BCE)]ClO ₄ (A), [Co(R-acac) ₂ (DCE)]ClO ₄ (B), [Co(mmst)TPA]ClO ₄ ·4H ₂ O (C) e [Co(c343haH)(TPA)(COOH) _n](ClO ₄) (D).....	9
Figura 1.5 Complexos tricarbonilrênio(I) (A-D, G) e oxo-rênio(V) (E-F).....	12
Figura 1.6 Estruturas dos radiofármacos cardiolite (A) e MDP- ^{99m} Tc (B), e do ligante HEDP (C).....	15
Figura 1.7 Estrutura geral de iminas (A) e seus derivados: hidrazonas (B) e tiossemicarbazonas (C). R ₁ , R ₂ , R ₃ e R ₄ = grupos alquil ou aril.....	16
Figura 1.8 Representação genérica da obtenção de bases de Schiff. R ₁ , R ₂ e R ₃ = grupos alquil ou aril.....	16
Figura 1.9 Estrutura geral de acil hidrazonas (A) e do derivado 2-acetilpiridinahidrazona (B). R ₁ , R ₂ e R ₅ = grupos alquil ou aril.....	17
Figura 1.10 Isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> de tiossemicarbazonas α-(<i>N</i>)-heterocíclicas. R ₂ , R ₃ e R ₄ = grupos alquil ou aril.....	19
Figura 3.1 Estrutura genérica dos complexos de rênio(I).....	41
Figura 3.2 Isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> da hidrazona H2AcPh.....	43
Figura 3.3 Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆) do ligante H2AcPh (200 MHz) e seu complexo [ReCl(CO) ₃ (H2AcPh)] (1) (400 MHz).....	47
Figura 3.4 Espectro de RMN de ¹³ C{ ¹ H} (DMSO-d ₆) do ligante H2AcPh (200 MHz) e seu complexo [ReCl(CO) ₃ (H2AcPh)] (1) (400 MHz).....	48
Figura 3.5 Esquema mostrando a doação de elétrons entre os orbitais <i>d</i> vazios do metal e um ligante do tipo π-doador (A) e π-receptor (B). Arranjo espacial de ligantes carbonil	

e ligantes L, com diferentes características aceptoras/doadoras, em torno do centro metálico (C). (i) e (ii) são as formas canônicas em torno do centro metálico.....	49
Figura 3.6 Espectros de absorção da região do infravermelho do complexo (1) e da hidrazona H2AcPh (vermelho), obtidos em pastilha de KBr. Região de 4000 a 400 cm ⁻¹ (A) e região expandida (1700 a 400 cm ⁻¹) (B).....	51
Figura 3.7 Diagramas ORTEP de: [ReCl(CO) ₃ (H2AcPh)] (1) (A), [ReCl(CO) ₃ (H2Ac _p ClPh)]·DMSO (2a) (B) e [ReCl(CO) ₃ (H2Ac _p NO ₂ Ph)]·DMSO (3a) (C).....	54
Figura 3.8 Complexos de rênio(I) causam apoptose em células NCI-H460 com subsequente dano mitocondrial. Citometria de fluxo de células NCI-H460 marcadas com anexina V-FITC/IP após 3 ou 6 h de tratamento com os complexos (2) e (3) a 10 μM (A). Quantificação de células apoptóticas tratadas com os complexos (2) ou (3) a 10 μM (B). Modificação do potencial de membrana mitocondrial em resposta aos complexos (2) e (3) a 5, 10 ou 20 μM avaliada pela intensidade de fluorescência de TMRE (C). As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes (p* < 0,05 e p*** < 0,001 <i>versus</i> controle).....	62
Figura 3.9 Atividade antioxidante dos complexos de rênio(I). As células NCI-H460 foram tratadas com os complexos (2) e (3) a 5, 10 ou 20 μM e marcadas com DHE para avaliar, por citometria de fluxo, mudanças na produção de ROS observadas em células apoptóticas. As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes. p*** < 0,001 <i>versus</i> controle.....	64
Figura 3.10 Espectros de emissão (λ _{exc} = 295 nm) do sistema ASH-1 (tampão 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl; pH = 7,4); (a) 2,0 μM de ASH; (b-h) 2,0 μM de ASH na presença de 1,86; 3,71; 5,54; 7,36; 9,17; 11,0 e 12,8 μM de 1 (A). Condições experimentais: λ _{exc} = 295 nm e T = 25 °C. Gráficos de F ₀ /F _{corr} vs [Q] (B) e log[(F ₀ - F _{corr})/F _{corr}] vs log[Q] (C) para os dados de λ _{em} = 340 nm.....	66
Figura 4.1 Estrutura genérica dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas.....	69
Figura 4.2 Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) do ligante H2Ac _p ClPh (acima) e seu complexo [Co(2Ac _p ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5).....	72
Figura 4.3 Espectro de RMN de ¹³ C{ ¹ H} (50 MHz, DMSO-d ₆) do ligante H2Ac _p ClPh (acima) e seu complexo [Co(2Ac _p ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5).....	73
Figura 4.4 Espectros de absorção da região do infravermelho do complexo (5) e da	

hidrazona H2Ac p ClPh (vermelho), obtidos em pastilha de KBr. Região de 4000 a 400 cm ⁻¹ (A) e região expandida (1800 a 400 cm ⁻¹) (B).....	75
Figura 4.5 Diagramas ORTEP: molécula [1] (A), molécula [2] (B) e unidade assimétrica de [Co(2AcPh) ₂]ClO ₄ ·0,5H ₂ O·0,5DMSO (4a) (C).....	77
Figura 4.6 Estrutura genérica dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas....	81
Figura 4.7 Espectros de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) do ligante H2Ac4 o ClPh (acima) e seu complexo [Co(2Ac4 o ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9).....	87
Figura 4.8 Espectros de RMN de ¹³ C{ ¹ H} (50 MHz, DMSO-d ₆) do ligante H2Ac4 o ClPh (acima) e seu complexo [Co(2Ac4 o ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9).....	88
Figura 4.9 Espectros de absorção da região do infravermelho do complexo (9) e da tiossemicarbazona H2Ac4 o ClPh (vermelho), obtidos em pastilha de KBr. Região de 4000 a 400 cm ⁻¹ (A) e região expandida (1700 a 400 cm ⁻¹) (B).....	90
Figura 4.10 Diagrama ORTEP do complexo [Co(2Ac4 p ClPh) ₂]Cl·CH ₃ OH (8a). O solvente de cristalização e o contra-íon foram omitidos.....	91
Figura 4.11 Voltamogramas cíclicos do complexo [Co(2Ac4 p ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8) a 100 mV s ⁻¹ de -1,8 a 1,8 V (linha pontilhada) e região expandida de -1,8 a -0,2 V (negrito).....	95
Figura 4.12 Voltamogramas cíclicos dos complexos [Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4), [Co(2Ac p ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5), [Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7), [Co(2Ac4 p ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8) e [Co(2Ac4 o ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9) a 100 mV s ⁻¹	97
Figura 4.13 Voltamogramas cíclicos do complexo [Co(2Ac4 p ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8) a 25, 50, 75, 100, 200 e 500 mV s ⁻¹	98
Figura 4.14 Plote linear da corrente de pico anódico (<i>i</i> _{pa}) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura (v ^{1/2}) para os pares de picos Co ^{III} /Co ^{II} (A) e Co ^{II} /Co ^I (B) do complexo [Co(2Ac4 p ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8).....	99
Figura 4.15 Voltamogramas cíclicos dos complexos: [Co(2Ac p NO ₂ Ph) ₂]Cl·2,5H ₂ O (6) (A); [Co(2Ac4 p NO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (10) (B) e [Co(2Ac4 o NO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (11) (C) a 100 mV s ⁻¹	100
Figura 4.16 Espectros eletrônicos: complexo [Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4) na presença de 3 equivalentes molares de Na ₂ S ₂ O ₄ (DTN) (A) e complexo [Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7) na presença de 10 equivalentes molares de DTN (B). Os espectros eletrônicos dos complexos (4) e (7) e dos ligantes livres (H2AcPh e H2Ac4Ph) na ausência de DTN também foram obtidos nas mesmas condições experimentais.....	102
Figura 4.17 Espectros de massas: ligante H2AcPh (A) e complexo (4) na ausência de	

DTN (B), complexo (4) na presença de 3 equivalentes molares de DTN, t = 10 min (C) e t = 60 min (D). C = 25 μ M em tampão Tris-HCl 5 % DMSO, pH = 7,2.....	103
Figura 4.18 Esquema de síntese do complexo [Co(2Ac4Ph)(TPA)](ClO ₄) ₂	104
Figura 4.19 Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 295$ nm) do sistema ASH- 4 (tampão 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl; pH = 7,4); (a) 2,0 μ M de ASH; (b-h) 2,0 μ M de ASH na presença de 1,67; 3,33; 4,98; 6,61; 8,24; 9,85 e 11,5 μ M de 4 (A). Condições experimentais: $\lambda_{exc} = 295$ nm e T= 25 °C. Gráficos de F ₀ /F _{corr} vs [Q] (B) e log[(F ₀ - F _{corr})/F _{corr}] vs log[Q] (C) para os dados de $\lambda_{em} = 340$ nm.....	113
Figura 4.20 Espectro de absorção do complexo (4) nas concentrações (b-h): 1,67; 3,33; 4,98; 6,61; 8,24; 9,85 e 11,5 μ M.....	114

Lista de Tabelas

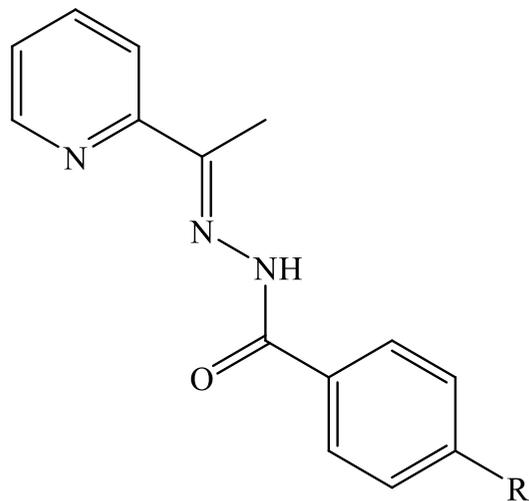
Tabela 2.1 Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração 1,0 mM (DMF).....	24
Tabela 3.1 Rendimento, temperatura de decomposição ^a , análise elementar ^b , termogravimetria ^b , massa molar e condutividade molar (DMF, 1 mM) dos complexos [ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1), [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p ClPh)]·0,5C ₇ H ₈ (2) e [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)]·0,5C ₇ H ₈ (3).....	42
Tabela 3.2 Atribuições (A), número de hidrogênio (N ^o), multiplicidade ^a e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹ H dos complexos (1-3) e hidrazonas livres (DMSO-d ₆).....	44
Tabela 3.3 Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹³ C{ ¹ H} e DEPT 135 dos complexos (1-3) e hidrazonas livres (DMSO-d ₆).....	45
Tabela 3.4 Número de onda / cm ⁻¹ das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos [ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1), [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p ClPh)]·0,5C ₇ H ₈ (2) e [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)]·0,5C ₇ H ₈ (3), e hidrazonas livres.....	50
Tabela 3.5 Resumo da coleção de dados cristalográficos e resultados dos refinamentos das estruturas cristalográficas das hidrazonas H ₂ AcPh e H ₂ Ac _p ClPh e dos complexos [ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1), [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p ClPh)]·DMSO (2a) e [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)]·DMSO (3a).....	55
Tabela 3.6 Principais comprimentos (Å) de ligação das hidrazonas H ₂ AcPh e H ₂ Ac _p ClPh e dos complexos [ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1), [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p ClPh)]·DMSO (2a) e [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)]·DMSO (3a). Desvio padrão entre parênteses.....	56
Tabela 3.7 Principais ângulos (°) de ligação das hidrazonas H ₂ AcPh e H ₂ Ac _p ClPh e dos complexos [ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1), [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p ClPh)]·DMSO (2a) e [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)]·DMSO (3a). Desvio padrão entre parênteses.....	57
Tabela 3.8 Distâncias de ligações de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para os complexos [ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1), [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p ClPh)]·DMSO (2a) e [ReCl(CO) ₃ (H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)]·DMSO (3a).....	58
Tabela 3.9 CIM / μM das hidrazonas, seus complexos de rênio(I), [ReCl(CO) ₅], ciprofloxacina e cloridrato de tetraciclina contra <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> e	

<i>P. aeruginosa</i>	59
Tabela 3.10 Viabilidade celular <i>in vitro</i> (CI ₅₀ / μM) das hidrazonas, seus complexos de rênio(I) e o precursor [ReCl(CO) ₅] contra as células NCI-H460 e HUVEC.....	60
Tabela 3.11 Valores de absorvância dos complexos (1-3) na região UV-Vis.....	66
Tabela 3.12 Constante de supressão bimolecular (K_q), constante de associação do complexo (K_s), constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) para o sistema [ASH-complexos de Re(I)].....	67
Tabela 4.1 Rendimento, temperatura de fusão ou decomposição ^a , análise elementar ^b , termogravimetria ^b , massa molar e condutividade molar (DMF, 1 mM) dos complexos [Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4), [Co(2Ac <i>p</i> ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5) e [Co(2Ac <i>p</i> NO ₂ Ph) ₂]Cl·2,5H ₂ O (6).....	70
Tabela 4.2 Atribuições (A), número de hidrogênio (N ^o), multiplicidade ^a , deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H (acima), atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹³ C{ ¹ H} e DEPT ^b 135 (abaixo) dos complexos (4-6) e hidrazonas livres (DMSO-d ₆).....	71
Tabela 4.3 Número de onda / cm ⁻¹ das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos (4-6) e hidrazonas livres.....	74
Tabela 4.4 Resumo da coleção de dados cristalográficos e resultados do refinamentos das estruturas cristalográficas da hidrazona H2AcPh e do complexo [Co(2AcPh) ₂]ClO ₄ ·0,5H ₂ O·0,5DMSO (4a).....	78
Tabela 4.5 Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação da hidrazona H2AcPh e do complexo [Co(2AcPh) ₂]ClO ₄ ·0,5H ₂ O·0,5DMSO (4a). Desvio padrão entre parênteses.....	79
Tabela 4.6 Rendimento, temperatura de fusão ou decomposição ^a , análise elementar ^b , termogravimetria ^b , massa molar e condutividade molar (DMF, 1 mM) dos complexos [Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7), [Co(2Ac4 <i>p</i> ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8), [Co(2Ac4 <i>o</i> ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9), [Co(2Ac4 <i>p</i> NO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (10) e [Co(2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (11).....	82
Tabela 4.7 Atribuições (A), número de hidrogênio (N ^o), multiplicidade ^a , deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹ H dos complexos (7-11) e tiossemicarbazonas livres (200 MHz, DMSO-d ₆).....	84

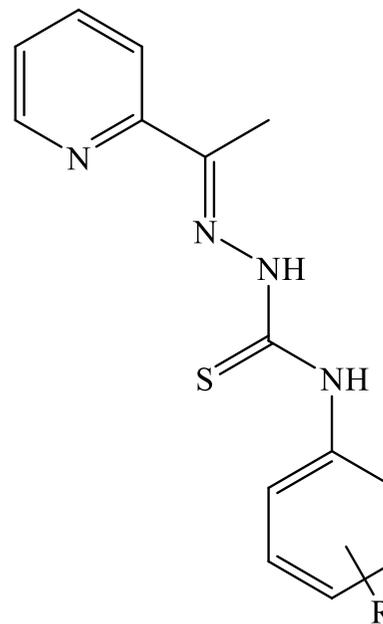
Tabela 4.8 Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 dos complexos (7-11) e tiossemicarbazonas livres (50 MHz, DMSO- d_6).....	86
Tabela 4.9 Número de onda / cm^{-1} das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos (7-11) e tiossemicarbazonas livres.....	89
Tabela 4.10 Resumo da coleção de dados cristalográficos e resultados dos refinamentos das estruturas cristalográficas da tiossemicarbazona H2Ac4pClPh e do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (8a).....	92
Tabela 4.11 Principais comprimentos (Å) e ângulos ($^\circ$) de ligação da tiossemicarbazona H2Ac4pClPh e do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (8a). Desvio padrão entre parênteses.....	93
Tabela 4.12 Potenciais redox para os pares $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ dos complexos $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4), $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (5), $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (7), $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (8) e $[\text{Co}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (9) a 100 mV s^{-1}	96
Tabela 4.13 Potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa} / V vs. Ag/AgCl) e correntes de picos catódicos e anódicos (i_{pc} e i_{pa} / μA) para os pares redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (8) em diferentes velocidades de varredura (v / mV s^{-1}).....	98
Tabela 4.14 Potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa} / V vs. Ag/AgCl) dos complexos $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (6), $[\text{Co}(\text{2Ac4pNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10) e $[\text{Co}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (11) a 100 mV s^{-1}	100
Tabela 4.15 CIM / μM das hidrazonas e tiossemicarbazonas, seus complexos de cobalto(III), os sais $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3$, ciprofloxacina e cloridrato de tetraciclina contra <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	106
Tabela 4.16 CI_{50} / μM das hidrazonas, seus complexos de cobalto(III), os sais $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3$, nitrato de miconazol e nistatina contra as espécies de fungos do gênero <i>Candida</i> : <i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i>	108
Tabela 4.17 Efeito citotóxico (CI_{50} / μM ou % de inibição) das hidrazonas e tiossemicarbazonas, seus complexos de cobalto(III), etoposídeo e cisplatina contra	

linhagens celulares HL60, Jurkat, THP-1, Vero, MCF-7, MDA-MB231, MCF-7 e HCT-116.....	110
Tabela 4.18 Comparação dos valores de % de viabilidade celular dos complexos de cobalto(III), ligantes livres, sal $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e cisplatina contra células MCF-7 cultivadas nos modelos monocamada (2D) e <i>soft-agar</i> (3D).....	111
Tabela 4.19 Constante de supressão bimolecular (K_q), constante de associação do complexo (K_s), constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) para o sistema [ASH-complexos de Co(III)].....	113

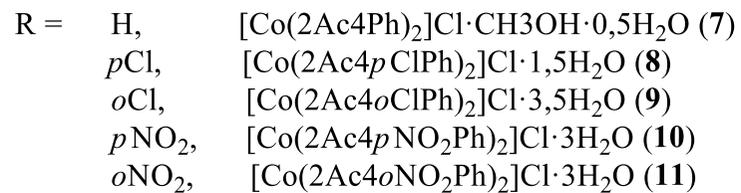
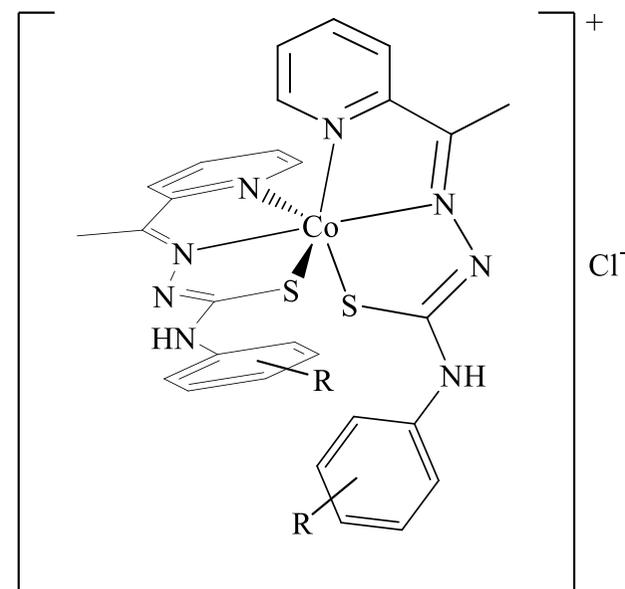
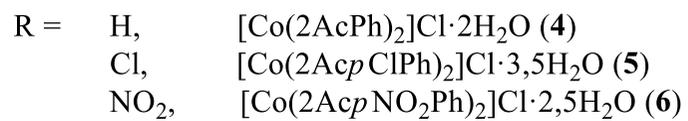
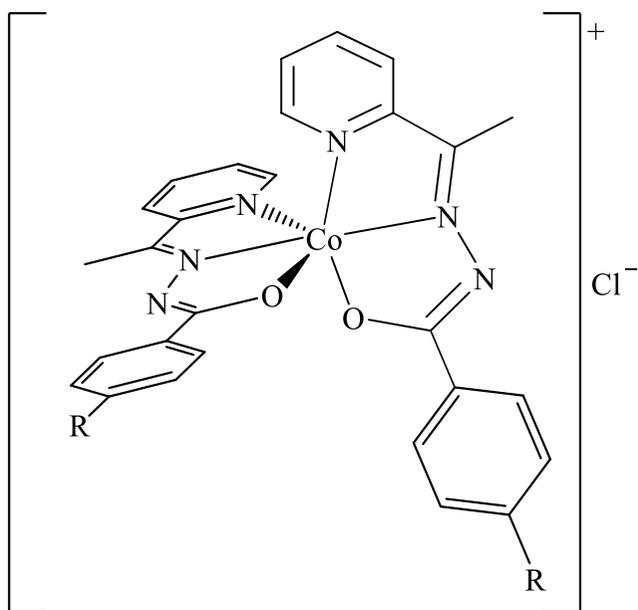
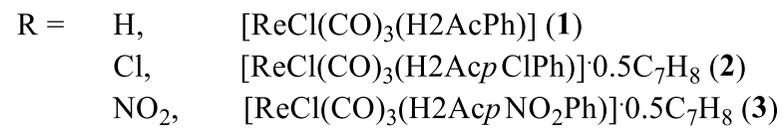
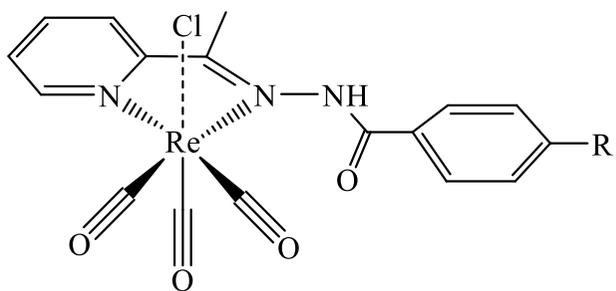
Índice de Estructuras



R = H, H2AcPh
Cl, H2Ac p ClPh
NO₂, H2Ac p NO₂Ph



R = H, H2Ac4Ph
 p Cl, H2Ac4 p ClPh
 o Cl, H2Ac4 o ClPh
 p NO₂, H2Ac4 p NO₂Ph
 o NO₂, H2Ac4 o NO₂Ph



Capítulo 1 Introdução

1.1 Química Medicinal Inorgânica

A Química Medicinal Inorgânica dedica-se à busca por complexos metálicos com propriedades farmacológicas para serem utilizados na terapia e diagnóstico. Constitui igualmente área de interesse o planejamento de ligantes para metalofármacos ou que ajam por meio da coordenação a metais de sítios ativos de enzimas envolvidas em patologias.¹

Muitos metais desempenham papéis cruciais em processos biológicos, uma vez que interagem com biomoléculas tais como proteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN), formando compostos de coordenação estáveis. Além disso, os mesmos podem exercer função estrutural, transportar oxigênio e elétrons, e catalisar reações de oxirredução. Um exemplo seria o ferro presente na hemoglobina, proteína responsável pela absorção e transporte de oxigênio molecular (O_2) no sangue.² Devido à importância dos metais no funcionamento dos sistemas biológicos surgiu o interesse do uso dos mesmos como medicamentos.

Os metais têm sido utilizados na medicina há cerca de 5000 anos no tratamento e prevenção de doenças. Por exemplo, ouro (China e Arábia) e ferro (Egito) eram utilizados na fabricação de medicamentos e o cobre era utilizado pelos egípcios na esterilização da água.³ No fim do século XIX foi descoberto que o sal dicianoaurato(I) de potássio ($K[Au(CN)_2]$) apresentava efeito citotóxico contra o bacilo da tuberculose e desde então, vários sais de ouro foram amplamente utilizados para o tratamento da tuberculose, inflamação e artrite reumatoide.⁴ No início do século XX, Paul Ehrlich utilizou complexos de arsênio para o tratamento de sífilis e introduziu as primeiras ideias sobre relações estrutura-atividade para esses compostos.² Os trabalhos realizados por Paul Ehrlich, considerado o pai da Quimioterapia, e Alfred Werner, considerado o pai da Química de Coordenação, favoreceram o desenvolvimento da Química Medicinal Inorgânica.

A Química Medicinal Inorgânica teve grande impulso em 1965 com a descoberta, por Barnett Rosenberg e colaboradores, das propriedades antitumorais do *cis*(diaminodicloro)platina(II), conhecido como cisplatina (Figura 1.1 A).⁵ Essa descoberta impulsionou a busca pelo desenvolvimento de novos fármacos à base de metais. Alguns exemplos de compostos em uso clínico para a terapia incluem compostos de lítio (carbonato de lítio, antidepressivo), ferro (nitroprussiato de sódio, vasodilatador, Figura 1.1 B) e gálio (nitrato

¹ H. Beraldo, *Cienc. Cult.* 63 (2011) 29.

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

³ H. Beraldo, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* 6 (2005) 4.

⁴ A. M. C. Benite, S. P. Machado, E. J. Barreiro, *Revista Eletrônica de Farmácia* IV-2 (2007) 131.

⁵ K. H. Thompson, C. Orvig, *Science* 300 (2003) 936.

de gálio, tratamento de hipercalcemia dos processos malignos).⁶⁻⁸ A auranofina por exemplo (Figura 1.1 C) foi aprovada pela FDA (*Food and drug administration*) em 1985 para o uso clínico no tratamento de artrite reumatoide.⁹

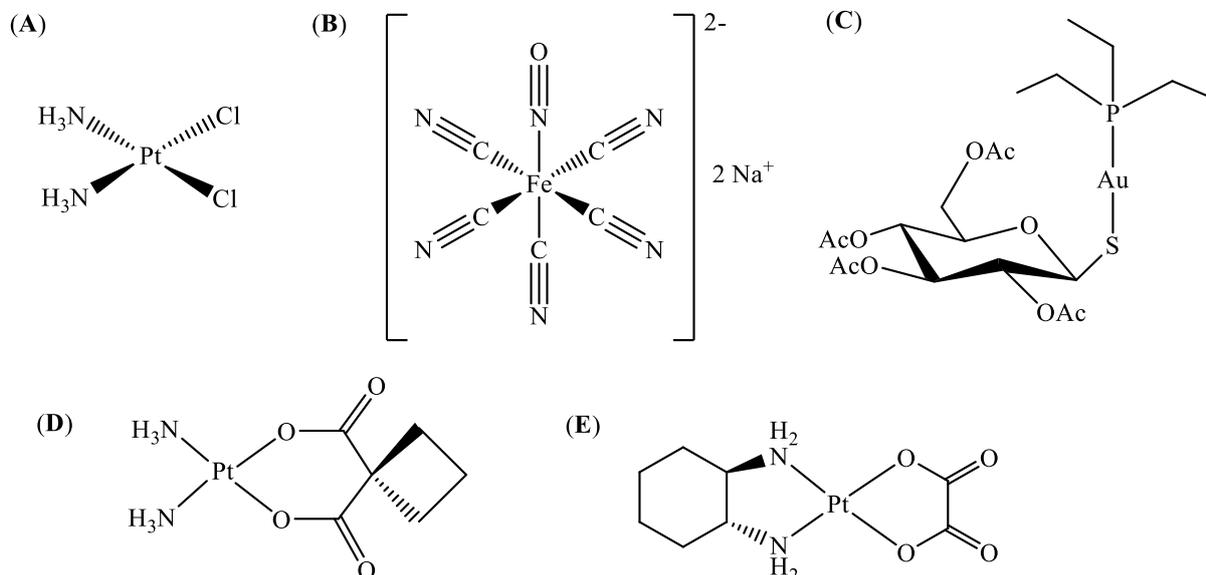


Figura 1.1 Representação estrutural dos compostos: cisplatina (A), nitroprussiato de sódio (B), auranofina (C), carboplatina (D) e oxaliplatina (E).⁵⁻¹¹

A eficiência da cisplatina principalmente no tratamento de cânceres de ovário e testículo, bem como os diversos efeitos colaterais associados ao uso desse medicamento, impulsionaram a busca pelo desenvolvimento de outros complexos a base de platina(II) conhecidos como carboplatina [*cis*-diamino-(1,1-ciclobutanocarboxilato)platina(II)] (Figura 1.1 D) e oxaliplatina [1,2-ciclohexanodiamino-(oxalato)platina(II)] (Figura 1.1 E), atualmente em uso clínico para diversos tipos de cânceres.^{10,11}

Atualmente, o grande problema na busca de compostos com atividade antitumoral para o uso clínico tem sido a baixa seletividade dos mesmos em relação às células tumorais. Sendo assim, torna-se interessante a escolha de metais e ligantes adequados visando direcionar o composto para o local desejado, aumentando o índice terapêutico e evitando danos às células saudáveis.

⁶ S. M. Cohen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (2007) 115.

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

⁸ C. R. Chitambar, *Curr. Opin. Oncol.* 16 (2004) 547.

⁹ S. L. Queiroz, A. A. Batista, *Quim. Nova* 19 (1996) 651.

¹⁰ K. R. Harrap, *Cancer Res.* 55 (1995) 2761.

¹¹ S. J. Berners-Price, L. Ronconi, P. J. Sadler, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 49 (2006) 65.

1.2 Fármacos e metalofármacos biorredutíveis para o tratamento do câncer

O câncer é um conjunto de doenças causadas pela multiplicação descontrolada de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo caracterizando a metástase.¹² O crescimento desordenado das células pode levar à formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas, os quais podem ser divididos em tumores sólidos (ex.: carcinomas e sarcomas) ou tumores não sólidos (ex.: leucemias e linfomas). Os diferentes tipos de câncer estão relacionados aos vários tipos de células do corpo. O carcinoma, por exemplo, é desenvolvido a partir de células epiteliais como pele ou mucosas. O sarcoma se inicia em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem. A leucemia é uma doença dos glóbulos brancos cuja principal característica é o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea. Os linfomas são cânceres que se desenvolvem nos gânglios linfáticos (linfonodos), estruturas responsáveis pelo combate às infecções.^{12,13}

O câncer é um dos principais alvos de pesquisas em Química Medicinal e Química Medicinal Inorgânica, em função da baixa especificidade dos agentes terapêuticos em uso clínico e baixa eficácia dos tratamentos tradicionais disponíveis (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) gerando uma alta taxa de mortalidade. Com base nas informações do projeto Globocan/Iarc, em relação a estimativa mundial realizada em 2012, foram previstos 14 milhões de novos casos de câncer e 8 milhões de óbitos. Registros mostraram que 60 % dos novos casos e 70 % da mortalidade ocorreram em países em desenvolvimento. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer dos quais cânceres de pele não melanoma, próstata e mama serão os mais frequentes.¹²

A quimioterapia é um dos métodos mais utilizados no tratamento de câncer. A quimioterapia envolve o uso de fármacos cuja função é matar ou diminuir a proliferação das células neoplásicas.¹³ A baixa especificidade dos agentes quimioterápicos, que atingem tanto células malignas quanto células normais, tem sido responsável pela geração de diversos efeitos colaterais nos pacientes em tratamento. Além disso, o sucesso dos agentes quimioterápicos tem

¹² INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 10 de janeiro de 2017.

¹³ V. L. de Almeida, A. Leitão, L. C. B. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, M. T. P. Lopes, *Quim. Nova* 28 (2005) 118.

sido limitado pelos mecanismos de resistência criados pelas células que compõem o tumor.^{14,15} Sendo assim, a busca por novos fármacos mais efetivos e seletivos tem sido alvo de pesquisas científicas no mundo todo.

O uso de quimioterápicos iniciou-se em 1940 com compostos conhecidos como mostardas de nitrogênio (*N*-mostardas). A partir de então um grande número de compostos anticâncer tem sido desenvolvido. A interação com ADN é um dos principais modos de ação dos fármacos em uso clínico. Os fármacos se subdividem nos seguintes grupos de acordo com o modo de interação com o ADN: agentes de ligações cruzadas, alquilantes, intercalantes, inibidores de topoisomerase, entre outros. Dentre os fármacos que interagem com o ADN por meio de ligações cruzadas entre duas fitas complementares (ligações interfitas) os grupos mais importantes são os complexos de platina (carboplatina, cisplatina e oxaliplatina) e *N*-mostardas (ciclofosfamida e ifosfamida).^{13,16}

Os tumores sólidos são caracterizados pela baixa concentração de oxigênio gerando um ambiente mais redutor em comparação com os tecidos normais. A estrutura do tumor é constituída por células neoplásicas (que ocupam metade do volume do tumor), vasos sanguíneos e o interstício (matriz que separa as células neoplásicas e a vascularização). A compressão de vasos sanguíneos em decorrência do crescimento tumoral ocasiona regiões com diferentes concentrações de oxigênio: camada externa composta por células oxigenadas (2 a 9 % de O₂), região intermediária (hipóxia, ≤ 2 % de O₂) e o núcleo da célula caracterizado por células em necrose (anóxia, ≤ 0,02 % de O₂).¹⁷⁻²⁰

Hipóxia em tumores sólidos tem sido relacionada ao insucesso da quimioterapia e radioterapia. No que diz respeito à quimioterapia, um dos fatores é a baixa vascularização (formação de vasos sanguíneos) dessas regiões, dificultando o transporte do fármaco para a região tumoral. Além disso, a divisão celular ocorre de maneira lenta em região de hipóxia, diminuindo a eficácia dos quimioterápicos que atuam no ciclo de divisão celular tal como a cisplatina. A baixa concentração de oxigênio também limita a eficácia da radioterapia, uma vez

¹⁴ C. Holohan, S. V. Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* 13 (2013) 714.

¹⁵ P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, W. Berger, *Drug Resist. Updates* 11 (2008) 1.

¹⁶ S. Nussbaumer, P. Bonnabry, J. Veuthey, S. Fleury-Souverain, *Talanta* 85 (2011) 2265.

¹⁷ E. T. Souza, P. J. S. Maia, E. M. Azevedo, C. R. Kaiser, J. A. L. C. Rezende, C. B. Pinheiro, T. A. Heinrich, R. S. da Silva, M. Scarpellini, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1767.

¹⁸ F. L. S. Bustamante, E. T. Souza, M. Lanznaster, M. Scarpellini, *Rev. Virtual Quim.* 1 (2009) 138.

¹⁹ B. J. Kim, T. W. Hambley, N. S. Bryce, *Chem Sci.* 2 (2011) 2135.

²⁰ R. B. Oliveira, R. J. Alves, *Quim. Nova* 25 (2002) 976.

que a mesma funciona por meio da geração de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxila (ROO^{\bullet}) e hidroxila (HO^{\bullet}) responsáveis pela degradação e desativação de moléculas essenciais.^{18,21}

Apesar de a hipóxia ser considerada um problema na terapia do câncer, esta pode ser explorada como alvo terapêutico uma vez que diferencia tecidos cancerosos de tecidos saudáveis. Pesquisas recentes têm sido direcionadas para o desenvolvimento de drogas biorredutíveis que são seletivamente ativadas em tecidos hipóxicos (Pró-Drogas Ativadas por Hipóxia - PDAHs).²²⁻²⁴ A ideia principal é que essas PDAHs se comportem como compostos inertes, capazes de passar intactos através do corpo até atingir as áreas de hipóxia, onde serão reduzidos para tornar-se altamente citotóxicos. Essa redução poderá ocorrer por nitro-redutases celulares no interior dos tumores e, assim, matar o tumor de dentro para fora.²⁵ Agentes biorredutíveis conhecidos na literatura compreendem quinonas, *N*-óxidos aromáticos e alifáticos, nitroimidazóis, mostardas nitroaromáticas (Figura 1.2) e alguns complexos metálicos.^{20,22,23}

Agentes citotóxicos seletivos para células em hipóxia tais como a mitomicina C (Figura 1.2 A), metronidazol (Figura 1.2 B) e misonidazol (Figura 1.2 C) têm sido utilizados em quimioterapia no tratamento de tumores sólidos. Os compostos tirapazamina (1,4-di-*N*-óxido-3-amino-1,2,4-benzotriazida, Figura 1.2 D) e mostardas nitroaromáticas (Figuras 1.2 E e F) também têm sido estudados como fármacos biorredutíveis e encontram-se em fase final de triagem clínica. A ativação redutiva desses compostos resulta na formação de espécies intermediárias altamente citotóxicas cujo o mecanismo de ação envolve algum tipo de interação (ligações interfitas, dano ou quebra da dupla hélice) com o ADN.²⁰

Além de compostos orgânicos, complexos metálicos também podem atuar como PDAHs. A estratégia consiste na coordenação de fármacos já conhecidos a centros metálicos, permitindo que substâncias antes rejeitadas para uso devido à elevada toxicidade voltem a ser utilizadas, já que é possível um maior direcionamento.

Complexos de platina(IV), rutênio(III), cobre(II), ferro(III) e cobalto(III), por exemplo, têm sido utilizados como pró-drogas biorredutíveis para direcionar o ligante biologicamente ativo para o ambiente redutor do tumor sólido por meio da redução Pt^{IV}/Pt^{II} , Ru^{III}/Ru^{II} , Cu^{II}/Cu^I , Fe^{III}/Fe^{II} e Co^{III}/Co^{II} .²³

²¹ B. A. Teicher, *Cancer Metastasis Rev.* 13 (1994) 139.

²² W. R. Wilson, M. P. Hay, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 393.

²³ N. Graf, S. J. Lippard, *Adv. Drug Deliv. Ver.* 64 (2012) 993.

²⁴ W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 577.

²⁵ E. T. Souza, L. C. Castro, F. A. V. Castro, L. C. Visentin, C. B. Pinheiro, M. D. Pereira, S. P. Machado, M. Scarpellini, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1355.

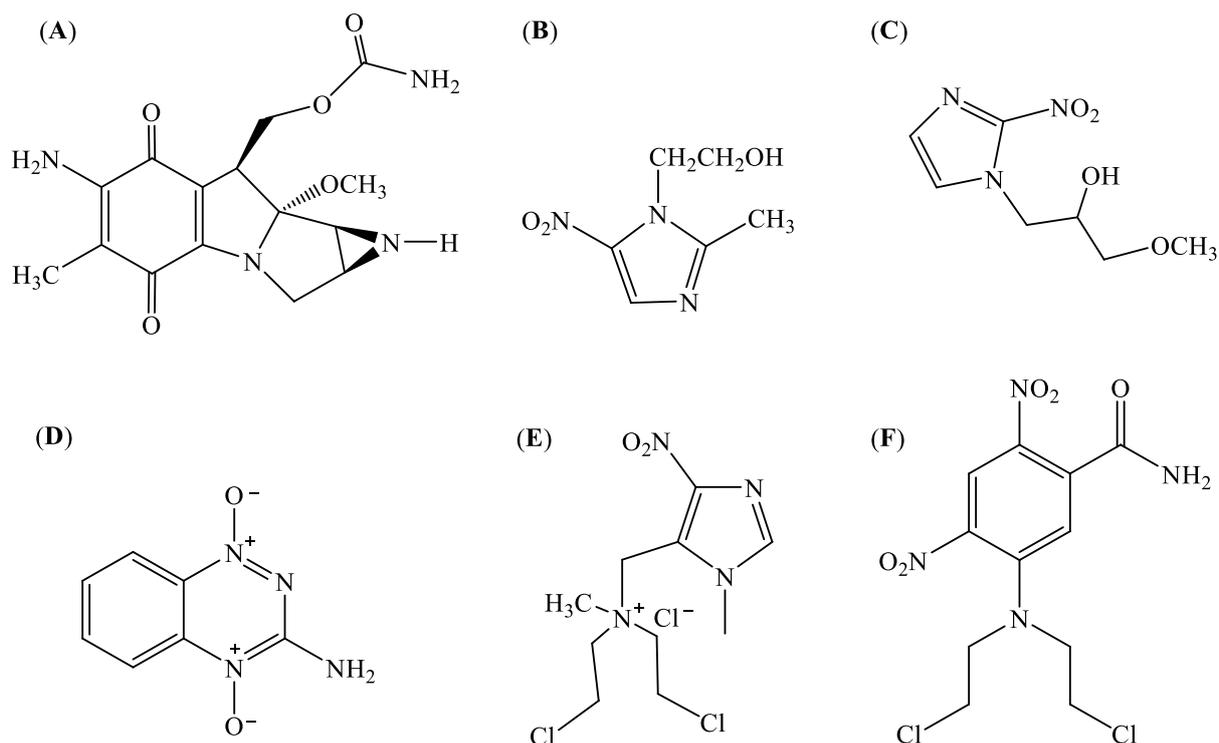


Figura 1.2 Classes de agentes biorredutíveis: quinonas (A), nitroimidazóis (B, C), *N*-óxidos (D) e nitro compostos contendo nitrogênio mostarda (E, F).²⁰

Cisplatina, normalmente em combinação com outros fármacos, tem sido utilizada em um de cada dois pacientes com câncer e tem tido resultado na cura de 90 % de câncer de testículo e alta atividade contra carcinomas de ovário, cervical, bexiga, cabeça e pescoço. Efeitos colaterais causadas por esse fármaco, bem como sua atividade frente a outros tipos de tumores podem ser diminuídos/melhorados usando pró-drogas com platina no seu estado de oxidação mais inerte, platina(IV).²⁶

A mitaplatina por exemplo, um complexo de geometria octaédrica, quando reduzida perde seus ligantes axiais, resultando num complexo de geometria quadrática plana, cisplatina (Figura 1.3 A). A atividade antitumoral da mitaplatina é similar a cisplatina e maior comparada a outros complexos de platina(IV) tais como tetraplatina, satraplatina e iproplatina (Figuras 1.3 B-D), os quais foram selecionados para triagem clínica e, no entanto, apresentaram menor atividade e maiores efeitos colaterais em relação à cisplatina.²³

²⁶ E. Reisner, V. B. Arion, B. K. Keppler, A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1569.

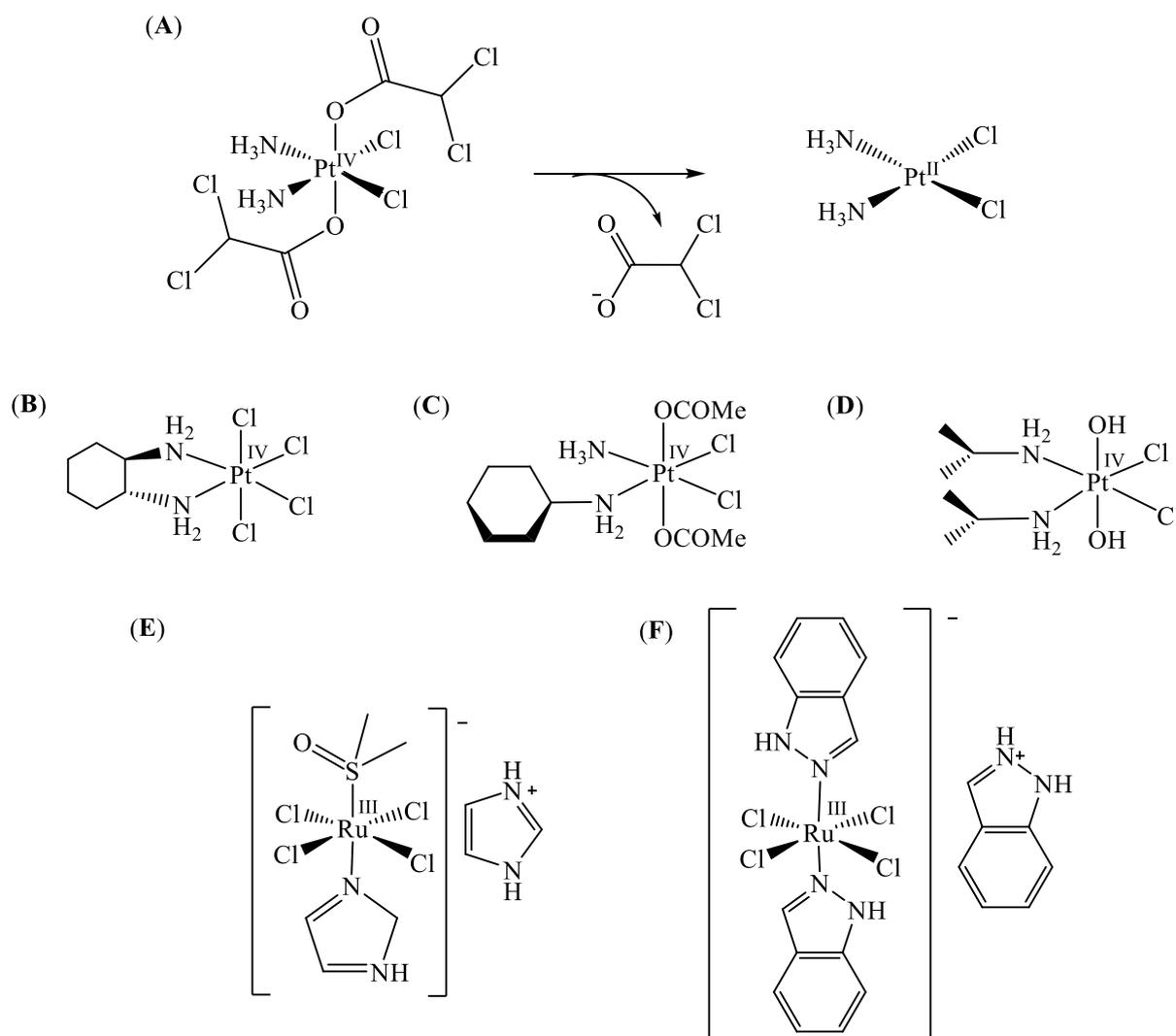


Figura 1.3 Complexos de platina(IV) e rutênio(III) como PDAHs. Esquema de redução da mitaplatina (A). Estrutura dos compostos tetraplatina (B), satraplatina (C), iroplatin (D), Nami-A (E) e KP1019 (F).^{22,27,28}

Os complexos de rutênio(III) mais promissores como candidatos a fármacos são os octaédricos contendo ligantes axiais *N*-heterocíclicos tais como (H₂im)-[*trans*-Ru^{III}Cl₄(Him)(SdmsO)] (**Nami-A**, Him = imidazol, S-dmsO = dmsO ligado por S) e (H₂ind)[*trans*Ru^{III}Cl₄(Hind)₂] (**KP1019**, Hind = indazol) (Figuras 1.3 E e F), os quais encontram-se em fase clínica II. Nami-A é o complexo de rutênio(III) mais estudado por sua atividade antiangiogênica e sua habilidade de prevenir a formação de metástase, em particular para câncer de pulmão.^{27,28} KP1019 possui atividade citotóxica principalmente frente a tumores colorretal. Nami-A e KP1019 são pró-drogas biorredutíveis que são ativadas após a formação

²⁷ M. Oszejca, G. Collet, G. Stochel, C. Kieda, M. Brindell, *BioMetals* 29 (2016) 1035.

²⁸ G. K. Gransbury, P. Kappen, C. J. Glover, J. N. Hughes, A. Levina, P. A. Lay, I. F. Musgrave, H. H. Harris, *Metallomics* 8 (2016) 762.

de complexos de rutênio(II) como espécies ativas. O mecanismo de ação desses compostos está relacionado com a troca de ligantes na posição equatorial e interações com proteínas.²³

O modo de ação de complexos de rutênio(III) diferencia dos complexos de platina(IV) uma vez que os primeiros mantêm a geometria octaédrica após a redução a rutênio(II). Complexos de rutênio geralmente apresentam menor efeito colateral em relação a fármacos a base de platina e são conhecidos por exibirem atividade em células resistentes ou não-sensíveis à cisplatina.²⁶

1.3 Complexos de cobalto(III) como candidatos a metalofármacos antitumorais: estratégia de redução do cobalto(III) a cobalto(II) para vetorizar o ligante para o tumor em condições de hipóxia

Os números de oxidação mais comuns para cobalto são +2 e +3. Sais de cobalto(III) são menos comuns do que sais de cobalto(II). Por outro lado, existem mais complexos de coordenação com cobalto(III), especialmente com ligantes *N*-doadores. Complexos de cobalto(III) normalmente são obtidos por métodos indiretos, ou seja, o ligante é adicionado em uma solução de um sal apropriado de cobalto(II) e o complexo de cobalto(II) formado é oxidado por um oxidante conveniente tal como oxigênio molecular. Geralmente, a maioria dos complexos de cobalto(III) são de baixo spin, configuração t_{2g}^6 e octaédricos.³⁷ A estabilidade desses complexos é devido à alta energia de estabilização do campo cristalino associada com a configuração t_{2g}^6 .

Levando em consideração a baixa capacidade oxidante de células em condições de hipóxia, compostos com características redox, tais como complexos de cobalto(III), têm sido investigados como potenciais PDAHs.²⁹⁻³² O princípio geral consiste na redução do cobalto(III) (inerte) para cobalto(II) (lábil) e consequente liberação seletiva do fármaco.³⁰

Uma série de complexos de cobalto(III) com ligantes bidentados contendo nitrogênio mostarda tais como *N,N'*-bis(2-cloroetil)-etilenodiamino (BCE) e *N,N'*-bis(2-cloroetil)-etilenodiamino (DCE) (Figuras 1.4 A e B) tiveram sua atividade citotóxica testada *in vitro* contra linhagens celulares de fibroblastos AA8 e UV4 (células derivadas de ovário de hamster chinês) em condições aeróbias e de hipóxia. Os resultados mostraram que alguns dos complexos

²⁹ T. W. Failes, C. Cullinane, C. I. Diakos, N. Yamamoto, J. G. Lyons, T. W. Hambley, *Chem. Eur. J.* 13 (2007) 2974.

³⁰ T. W. Failes, T. W. Hambley, *Dalton Trans.* (2006) 1895.

³¹ D. C. Ware, W. R. Wilson, W. A. Denny, C. E. F. Rickard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1991) 1171.

³² D. C. Ware, P. J. Brothers, G. R. Clark, W. A. Denny, B. D. Palmer, W. R. Wilson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 925.

foram menos citotóxicos frente a células aeróbicas e igualmente citotóxicos frente a células em hipóxia, em relação aos ligantes livres, sugerindo que os compostos seriam seletivamente ativados por hipóxia e que a citotoxicidade dos mesmos seria devida à liberação do ligante.³³

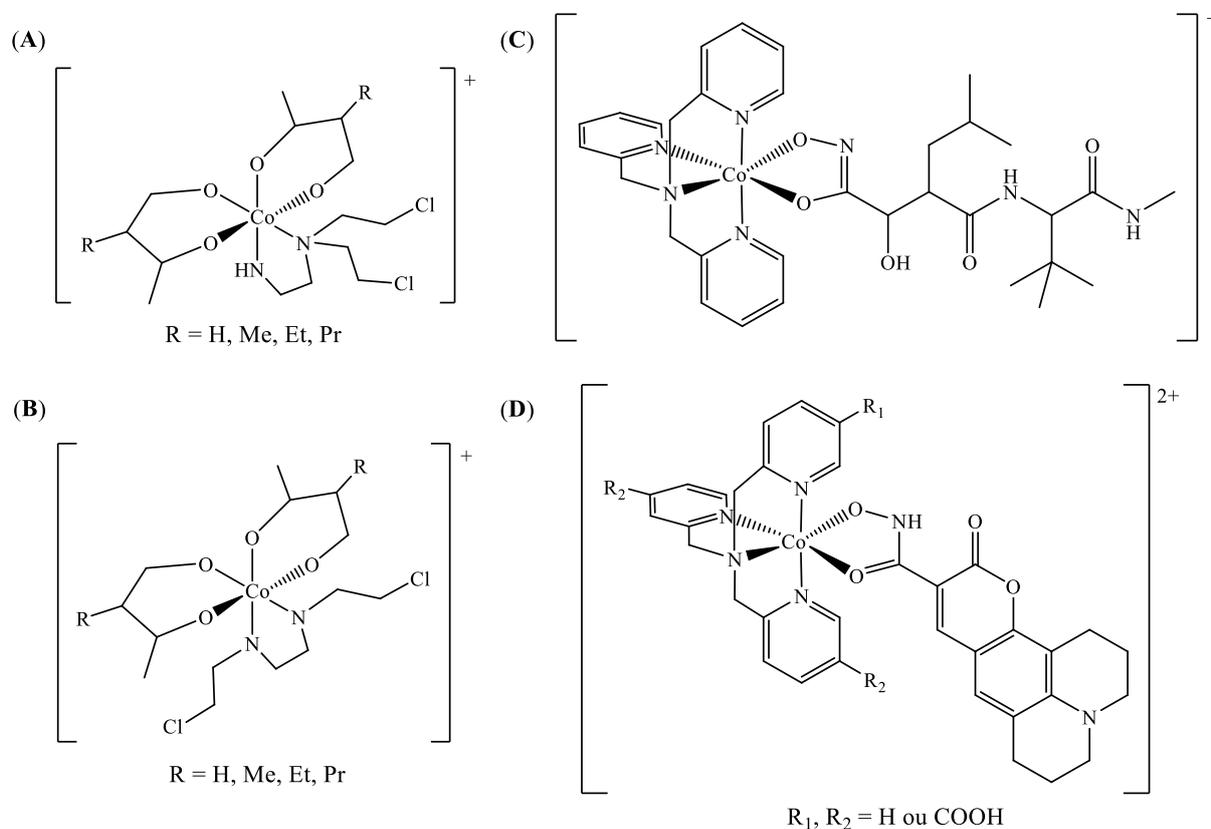


Figura 1.4 Complexos de cobalto(III) investigados como potenciais PDAH's:

$[\text{Co}(\text{R-acac})_2(\text{BCE})]\text{ClO}_4$ (A), $[\text{Co}(\text{R-acac})_2(\text{DCE})]\text{ClO}_4$ (B), $[\text{Co}(\text{mmst})\text{TPA}]\text{ClO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (C) e $[\text{Co}(\text{c343haH})(\text{TPA})(\text{COOH})_n](\text{ClO}_4)$ (D).^{28,33,35}

Complexos de cobalto(III) contendo o ligante tripodal *tris*(metilpiridil)amina (TPA) e o inibidor de metaloproteínase de matriz “marimastat” (mmstH₂ = *N*-[2,2-dimetil-1-(metilcarbamoil)propil]-2-[hidroxi(hidroxicarbamoil)metil]-4-metil-pentanamida) (Figura 1.4 C) foram testados *in vitro* contra células de câncer de ovário humano A2780.²⁹ Antes da redução o complexo exibe baixa citotoxicidade contra células A2780, indicando a estabilidade do mesmo em solução. Ensaio *in vivo* revelaram que tanto o complexo quanto o ligante marimastat livre inibem o crescimento do tumor. Além disso, os potenciais de redução dos complexos são adequados para que sejam ativados por biorredução em condições de hipóxia.

³³ D. C. Ware, B. D. Palmer, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1839.

Complexos de cobalto(III) contendo ligantes citotóxicos que se tornam fluorescentes quando liberados em região de hipóxia também têm sido estudados. Além do direcionamento do fármaco para o alvo específico por meio da redução, essa estratégia permite monitorar o momento e o lugar no qual o fluoróforo (agente citotóxico) será liberado.³⁴ Com base nesse princípio, complexos de cobalto(III) contendo os ligantes TPA e cumarina c343haH₂ (Figura 1.4 D) foram testados contra células de carcinoma colorretal humano DLD-1 cultivadas nos modelos monocamada e tridimensional. A complexação ao íon cobalto(III) não afetou atividade citotóxica da cumarina c343haH₂ frente a células de DLD-1 cultivadas em monocamada. Por outro lado, células DLD-1 (modelo 3D) tratadas com os complexos exibiram fluorescência, indicando a entrega do ligante fluorescente à célula tumoral bem como a seletividade desses complexos para região de hipóxia.³⁵

Tem sido relatado na literatura que a fluorescência de alguns compostos é suprimida após coordenação ao cobalto.³⁶ A fluorescência do complexo [Co(c343haH)tpa](ClO₄)₂, por exemplo, é suprimida cerca de 98-99 % em relação à cumarina c343haH₂ livre. A ativação por redutores celulares foi investigada por meio da obtenção de espectros de emissão de fluorescência dos complexos tratados com o redutor biológico ácido ascórbico em soluções oxigenadas e desoxigenadas. A liberação da cumarina foi evidenciada pelo aumento da intensidade de fluorescência, sendo este mais acentuado em soluções desoxigenadas, de acordo com o mecanismo proposto *via* redução de cobalto(III) para cobalto(II).³⁵

1.4 Complexos de rênio(I) como candidatos a metalofármacos e radiometalofármacos antitumorais

O rênio, juntamente com o manganês e o tecnécio, pertence ao Grupo 7 da tabela periódica. O elemento rênio ($Z = 75$, configuração eletrônica [Xe]4f¹⁴5d⁵6s²) é um metal extremamente raro, com abundância terrestre de 7×10^{-8} % (0,0007 ppm), que normalmente encontra-se associado ao molibdênio. Rênio é um metal que possui alta resistência à corrosão e possui alta capacidade refratária. No entanto, apresenta pouca aplicação devido a sua escassez e elevado custo.³⁷

Ao contrário do tecnécio, um elemento artificial cujo número atômico depende do isótopo produzido, o rênio possui dois isótopos de ocorrência natural cujas proporções relativas

³⁴ T. W. Hambley, *Dalton Trans.* (2007) 4929.

³⁵ N. Yamamoto, A. K. Renfrew, B. J. Kim, N. S. Bryce, T. W. Hambley, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 11013.

³⁶ M. D. Hall, T. W. Failes, N. Yamamoto, T. W. Hambley, *Dalton Trans.* (2007) 3983.

³⁷ N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, 2nd ed., U. K.: Butterworth-Heinemann, 1998.

em amostras terrestres são de 37,40 % ^{185}Re e 62,60 % ^{187}Re . São conhecidos complexos de rênio onde o metal adota estados de oxidação variando de 0 (d^5) a +7 (d^0) sendo que para os estados de oxidação maiores (+3 a +7) os complexos fluoro e oxo-rênio são predominantes.³⁷

Rênio é um dos metais que mostram propriedades nucleares de decaimento adequadas para aplicações em radioterapia. Os isótopos radioativos (emissores de partículas ionizantes β^-) de interesse em medicina nuclear são ^{186}Re (meia-vida de 90 horas) e ^{188}Re (meia-vida de 17 horas).³⁸

Complexos organometálicos contendo o grupo *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ (M = Tc e Re) têm sido largamente estudados objetivando o desenvolvimento de radiofármacos para diagnóstico e tratamento do câncer.³⁹ Complexos tricarbonilrênio(I) contendo o grupo 2-(dimetilamino)etoxi, $[\text{Re}(\eta^2\text{-Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O})(\text{CO})_3(\mu\text{-OH})\text{Re}(\eta^2\text{-Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O})(\text{CO})_3]$ (Figura 1.5 A) e $[\text{Re}_3(\mu_3\text{-OH})(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2\text{H})(\text{CO})_9]$ (Figura 1.5 B), mostraram-se ativos contra células leucêmicas e de tumores sólidos sendo estes, porém, mais seletivos em relação ao crescimento de tumores sólidos.⁴⁰ Além disso, todos os compostos testados foram inativos contra células não-cancerígenas de fibroblastos humanos (RMPI-1788). Complexos tricarbonilrênio(I) com *bis*(difenilfosfinometil)aminas (Figura 1.5 C) também apresentaram atividade significativa contra células de carcinoma mamário (MCF-7) e uterino (HeLa-S³).⁴¹

Na literatura existem diversos trabalhos de síntese e caracterização de complexos de rênio(I) com bases de Schiff.⁴²⁻⁴⁹ No entanto, a atividade antitumoral desses compostos tem sido pouco explorada. Complexos tricarbonilrênio(I) com salicilaldeído semicarbazonas *N,N*-disubstituídas (Figura 1.5 D) exibiram atividade altamente citotóxica contra células de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4) e foram não-citotóxicos contra células sadias de fibroblastos humano.⁵⁰

³⁸ J. Dilworth, S. Parrott, *Chem. Soc. Rev.* 27 (1998) 43.

³⁹ U. Abram, R. Alberto, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1486.

⁴⁰ W. Wang, Y. K. Yan, T. S. A. Hor, J. J. Vittal, J. R. Wheaton, I. H. Hall, *Polyhedron* 21 (2002) 1991.

⁴¹ J. Zhang, J. J. Vittal, W. Henderson, J. R. Wheaton, I. H. Hall, T. S. A. Hor, Y. K. Yan, *J. Organomet. Chem.* 650 (2002) 123.

⁴² R. Carballo, J. S. Casas, E. García-Martínez, G. Pereiras-Gabián, A. Sánchez, J. Sordo, E. M. Vázquez-López, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 6395.

⁴³ R. Carballo, J. S. Casas, E. García-Martínez, G. Pereiras-Gabián, A. Sánchez, J. Sordo, E. M. Vázquez-López, J. C. Garcia-Monteagudo, U. Abram, *J. Organomet. Chem.* 656 (2002) 1.

⁴⁴ A. R. Cowley, J. R. Dilworth, P. S. Donnelly, J. Woollard-Shore, *Dalton Trans.* (2003) 748.

⁴⁵ P. Barbazán, R. Carballo, I. Prieto, M. Turnes, E. M. Vázquez-López, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 3102.

⁴⁶ J. Grewe, A. Hagenbach, B. Stromburg, R. Alberto, E. Vazquez-Lopez, U. Abram, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 629 (2003) 303.

⁴⁷ A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, E. M. Vázquez-López, *Polyhedron* 27 (2008) 2867.

⁴⁸ G. Pereiras-Garbián, E. M. Vázquez-López, U. Abram, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 630 (2004) 1665.

⁴⁹ I. G. Santos, U. Abram, R. Alberto, E. V. Lopes, A. Sanchez, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 1834.

⁵⁰ J. Ho, W. Y. Lee, K. J. T. Koh, P. P. F. Lee, Y. Yan, *J. Inorg. Biochem.* 119 (2013) 10.

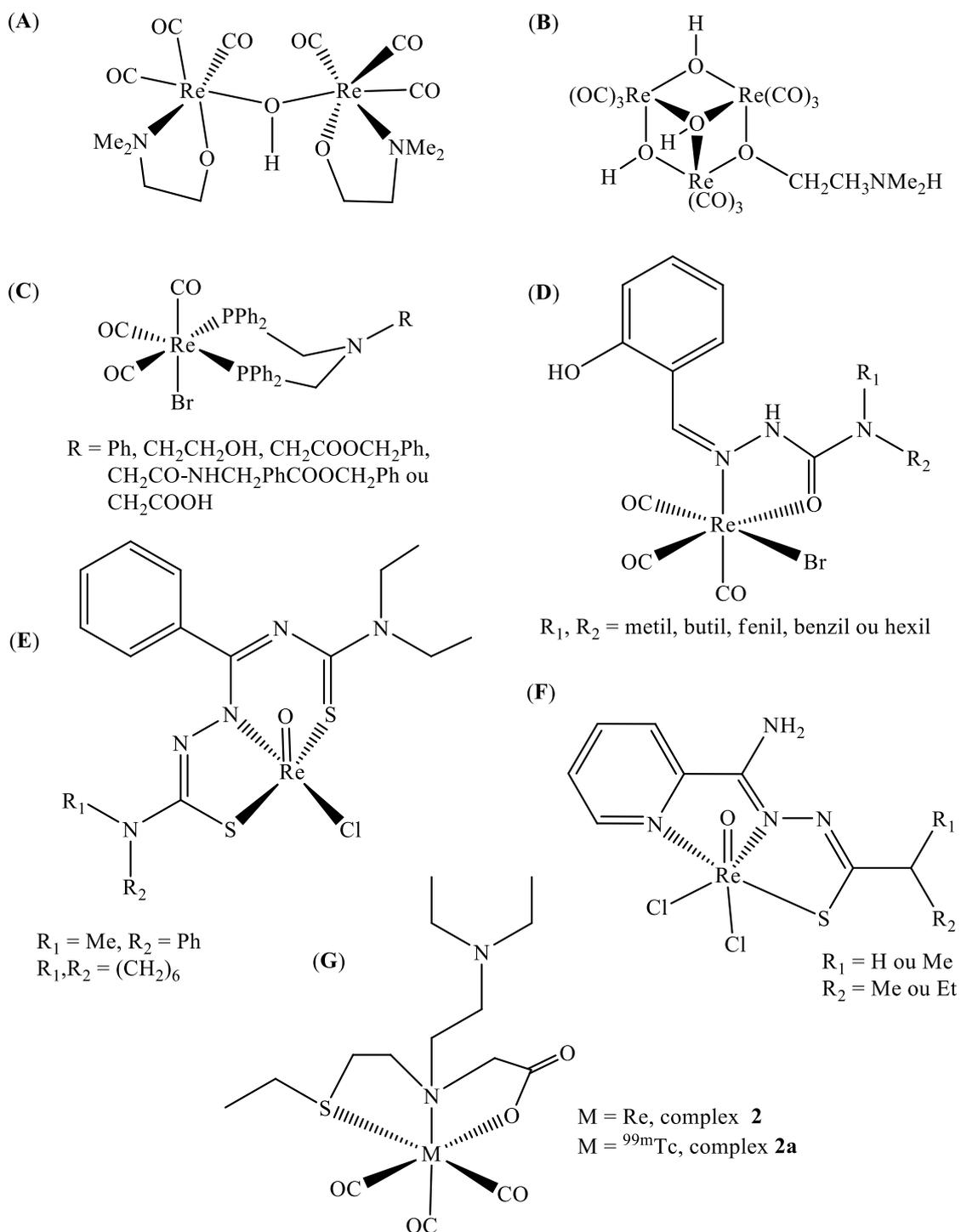


Figura 1.5 Complexos tricarbonylrênio(I) (A-D, G) e oxo-rênio(V) (E-F).^{40,41,50-52,55}

Complexos de oxo-rênio(V) com diversas tiossemicarbazonas *S,N,S*- e *N,N,S*-tridentadas, de composição geral [ReOCl(L)] (Figuras 1.5 E e F) provocaram uma redução

notável no crescimento de células de câncer de mama (MCF-7) em experimentos *in vitro*.^{51,52} Complexos de oxo-rênio(V) com outros ligantes tridentados também foram ativos contra células de hepatoma de rato (MG-22A).⁵³

Complexos de rênio(I) e tecnécio(I) são muito similares em termos de características físicas tais como tamanho, lipofilicidade, entre outras.³⁸ Devido à essa semelhança, complexos de rênio(I) frios (não-radioativos) contendo o grupo *fac*-[Re(CO)₃]⁺ têm sido utilizados como modelos de análogos de tecnécio.^{54,55}

Complexos organometálicos contendo o grupo *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = ^{99m}Tc e Re) e ligantes *N,S,O*-doadores derivados de cisteamina (Figura 1.5 G) foram testados biologicamente e os resultados indicaram que o complexo de ^{99m}Tc (**2a**) poderia ser utilizado no diagnóstico de melanoma.⁵⁵

1.5 Radiofármacos para o tratamento do câncer

Radiofármacos são fármacos contendo núcleos radioativos (radioisótopos ou radionuclídeos) utilizados em Medicina Nuclear como agentes de imagem para diagnóstico e, em menor extensão, para o tratamento de patologias e disfunções do organismo humano, particularmente no tratamento de tumores radio-sensíveis.⁵⁶ Radiofármacos são constituídos por duas partes: uma estrutura molecular que determina o destino do radiofármaco dentro do organismo (farmacocinética e farmacodinâmica) e um núcleo radioativo responsável pelo sinal detectável fora do organismo para subsequente visualização por métodos de medicina nuclear.⁵⁷ A Química Inorgânica possui um papel importante no desenvolvimento de radiofármacos, uma vez que a maioria dos radionuclídeos utilizados em medicina nuclear são metálicos.

Radiofármacos utilizados para diagnóstico são fármacos contendo radionuclídeos emissores de partículas pósitron (β^+ ou e^+) ou radiação eletromagnética gama (γ), que possuem baixo poder de ionização quando comparadas às radiações particuladas [elétrons Auger e partículas alfa (α) e beta (β^-)] emitidas pelo núcleo de átomos radioativos. A partir da emissão de radiações γ e β^+ é possível gerar uma imagem da distribuição do radiofármaco *in vivo* e obter

⁵¹ P. I. S. Maia, H. H. Nguyen, A. Hagenbach, S. Bergemann, R. Gust, V. M. Deflon, U. Abram, *Dalton Trans.* 42 (2013) 5111.

⁵² H. H. Nguyen, J. J. Jegathesh, P. I. S. Maia, V. M. Deflon, R. Gust, S. Bergemann, U. Abram, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 9356.

⁵³ I. Segal, A. Zablotskaya, T. Kniess, I. Shestakova, *Chem. Heterocycl. Compd.* 48 (2012) 296.

⁵⁴ S. L. Binkley, N. V. Barone, A. C. Underwood, A. Milsted, B. R. Franklin, R. S. Herrick, C. J. Ziegler, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 632.

⁵⁵ C. Moura, L. Gano, I. C. Santso, I. Santos, A. Paulo, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2011) 5405.

⁵⁶ E. B. Araújo, *Cadernos temáticos de Química Nova na Escola* 6 (2005) 31.

⁵⁷ W. Wadsak, M. Mitterhauser, *Eur. J. Radiol.* 73 (2010) 461.

informações bioquímicas e fisiológicas dos tecidos alvos. O menor poder de ionização dessas radiações minimiza a dose de radiação absorvida pelo paciente.^{56,58}

Os radionuclídeos utilizados para obtenção de imagens para diagnóstico devem emitir fótons com energia maior que 80 KeV. Radionuclídeos que sofrem decaimento a partir de emissão de radiações γ e β^+ possuem um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) relativamente curto (menos de um dia) porém suficientemente longo para sintetizar o radiofármaco, injetá-lo no paciente e obter a imagem utilizando a técnica adequada, Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT - *Single Photon Emission Computer Tomography*) ou Tomografia por Emissão de Positron (PET - *Positron Emission Tomography*). O tipo do instrumento escolhido para obtenção de imagens depende da faixa de energia emitida pelo radionuclídeo utilizado no tratamento. SPECT e PET são utilizadas para tomografia de tecidos marcados com emissores de raios γ [Ex.: ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6$ h), ^{123}I ($t_{1/2} = 13$ h) e ^{201}Tl ($t_{1/2} = 73,5$ h)] e partículas β^+ [Ex.: ^{11}C ($t_{1/2} = 20$ min), ^{13}N ($t_{1/2} = 10$ min) e ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min)], respectivamente.⁵⁹

Radiofármacos em uso clínico para SPECT são predominantemente compostos de tecnécio-99m (^{99m}Tc).³⁸ Um exemplo de radiofármaco utilizado para diagnóstico é o complexo de tecnécio(I) conhecido como cardiolite (Figura 1.6 A). Cardiolite é utilizado clinicamente como agente de imagem para avaliação da integridade do miocárdio em pacientes com suspeita de infarto.⁶⁰ Complexos de ^{99m}Tc também são utilizados para obtenção de imagens de cérebro, fígado, rins e ossos. O radiofármaco MDP- ^{99m}Tc (MDP = ácido metileno difosfônico) (Figura 1.6 B) por exemplo, é utilizado para identificação de metástase em pacientes com câncer nos ossos.³⁸

Para fins terapêuticos, são utilizados fármacos contendo radionuclídeos emissores de radiações ionizantes (elétrons Auger, partículas α ou β^-) que entregam uma dose de radiação citotóxica capaz de destruir o tecido alvo.⁵⁸ Os radionuclídeos utilizados em terapia possuem tempo de meia-vida na faixa de 1 a 10 dias.⁵⁹ Radiofármacos com núcleos radioativos emissores de partículas- β^- como por exemplo ^{131}I , ^{89}Sr , ^{153}Sm , ^{186}Re e ^{188}Re são utilizados para terapia do câncer.⁶¹ Os radiofármacos HEDP- ^{186}Re e HEDP- ^{188}Re (HEDP = hidroxietilideno difosfonato) são utilizados clinicamente no tratamento de metástase óssea (Figura 1.6 C).⁶² HEDP- ^{186}Re encontra-se em fase clínica-I/II para o tratamento de câncer de próstata.⁶³

⁵⁸ P Blower, *Dalton Trans.* (2006) 1705.

⁵⁹ S. Jurisson, D. Berning, W. Jia, D. Ma, *Chem. Rev.* 93 (1993) 1137.

⁶⁰ S. S. Jurisson, J. D. Lydon, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2205.

⁶¹ W. A. Volkert, T. J. Hoffman, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2269.

⁶² K. Liepe, J. Kotzerke, *Nucl. Med. Commun.* 28 (2007) 623.

⁶³ A. M. Denis-Bacelar, S. J. Chittenden, D. P. Dearnaley, A. Divoli, J. M. O'Sullivan, V. R. McCready, B. Johnson, Y. Du, G. D. Flux, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016). Doi: 10.1007/s00259-016-3543-x.

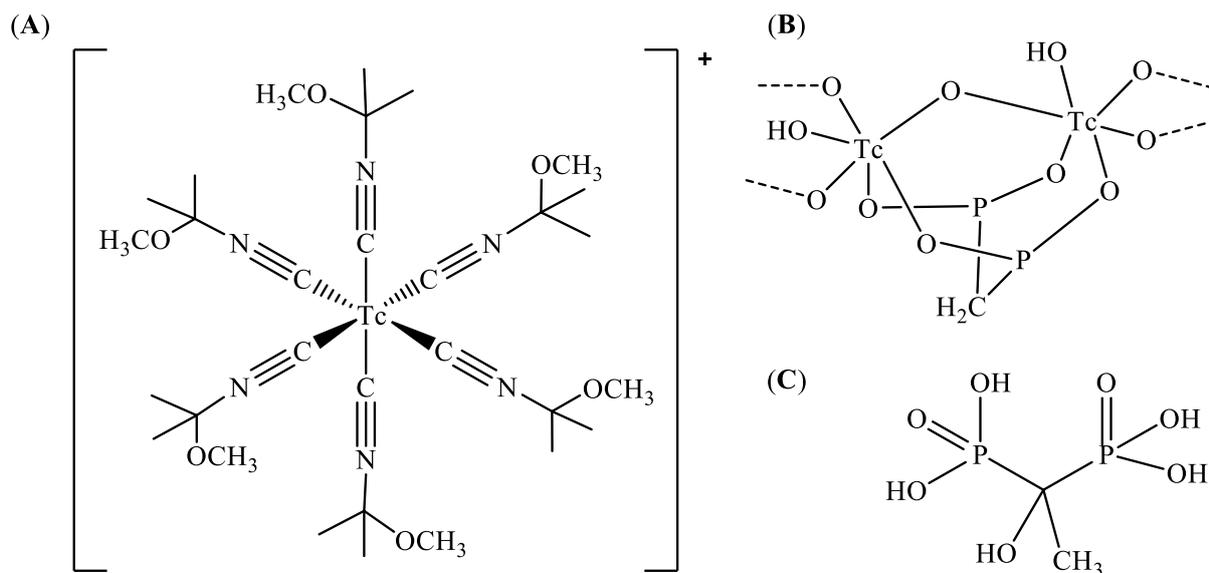


Figura 1.6 Estruturas dos radiofármacos cardiolite (A) e $\text{MDP-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ (B), e do ligante HEDP (C).^{38,60,62}

Sendo assim, complexos de rênio frios e complexos contendo os radionuclídeos $^{188/186}\text{Re}$ são interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antitumorais e radioterapêuticos. Além disso, como já foi dito, complexos de rênio frios com atividade citotóxica podem ser utilizados para o estudo de novos complexos de tecnécio com possível aplicação em medicina diagnóstica.

1.6 Bases de Schiff e suas aplicações na Química Medicinal: ligantes para candidatos a metalofármacos antitumorais

Bases de Schiff são substâncias conhecidas como iminas (ou azometinas) que apresentam como característica estrutural uma ligação dupla entre carbono e nitrogênio conforme mostrado na Figura 1.7. As bases de Schiff podem ser obtidas por meio da reação de condensação entre um aldeído ou cetona com uma amina primária, como exemplo hidrazidas ou tiossemicarbazidas,⁶⁴⁻⁶⁶ normalmente na presença de um catalisador ácido, conforme representado na Figura 1.8. Neste trabalho serão estudados dois derivados imínicos conhecidos como hidrazonas e tiossemicarbazonas (Figuras 1.7 B e C).

⁶⁴ H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34 (2001) 727.

⁶⁵ R. P. Tenório, A. J. S. Góes, J. G. Lima, A. R. de Faria, A. J. Alves, T. M. de Aquino, *Quim. Nova* 28 (2005) 1030.

⁶⁶ J. S. Casas, M. S. García-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.* 209 (2000) 197.

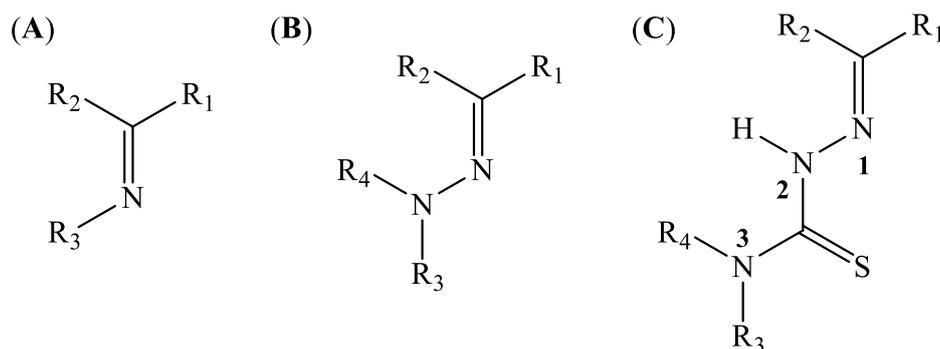


Figura 1.7 Estrutura geral de iminas (A) e seus derivados: hidrazonas (B) e tiossemicarbazonas (C).

R_1 , R_2 , R_3 e R_4 = grupos alquil ou aril.

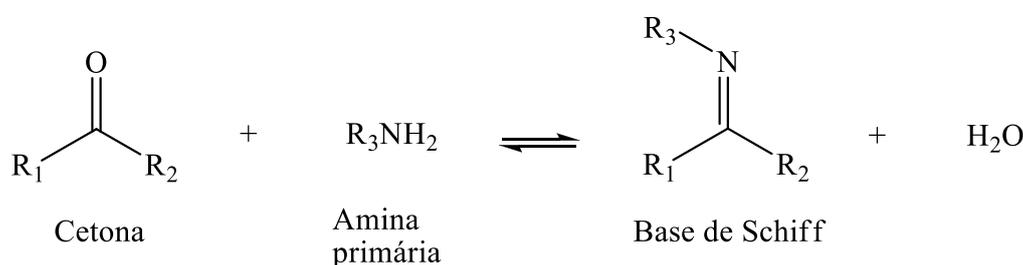


Figura 1.8 Representação genérica da obtenção de bases de Schiff.

R_1 , R_2 e R_3 = grupos alquil ou aril.

1.6.1 Hidrazonas

As propriedades químicas das hidrazonas têm sido estudadas em muitas áreas de pesquisa devido a sua alta habilidade complexante e suas aplicações farmacológicas. Estas são utilizadas como reagentes analíticos para a determinação de cobre em águas naturais⁶⁷ e também na agricultura como pesticidas.⁶⁸ As hidrazonas e seus derivados apresentam atividades biológicas diversas destacando-se as atividades antitumoral,⁶⁹ antimicrobiana,^{69,70} anti-inflamatória,⁷¹ antituberculose,⁷² anticonvulsivante,⁷⁰ analgésica,⁷³ antiproliferativa,⁷⁴ dentre outras.

⁶⁷ J. J. Pinto, C. Moreno, M. García-Vargas, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 844.

⁶⁸ N. Aggarwal, R. Kumar, C. Srivastva, P. Dureja, J. M. Khurana, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3056.

⁶⁹ L Savini, L. Chiasserini, V. Travagli, C. Pellerano, E. Novellino, S. Cosentino, M. B. Pisano, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 113.

⁷⁰ G. Küçüküzül, A. Mazi, F. Sahin, S. Öztürk, J. Stables, *Eur. J Med. Chem.* 38 (2003) 1005.

⁷¹ U. Salgin-Göksen, N. Gökhan-Kelekçi, O. Göktas, Y. Köysal, E. Kiliç, S. Isik, G. Aktay, M. Özalp, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 5738.

⁷² F. R. Pavan, P. I. S. 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.

⁷³ A. R. Todeschini, A. L. P. de Miranda, K. C. M da Silva, S. C Parrini, Eliezer J. Barreiro, *Eur. J. Med. Chem.* 33 (1998) 189.

⁷⁴ P. Vicini, M. Incerti, I. A. Doytchinova, P. La Colla, B. Busonera, R. Loddo, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 624.

Compostos derivados de hidrazonas tais como acil hidrazonas (Figura 1.9 A) possuem um sítio doador adicional, C=O, o que faz com que estes sejam ligantes versáteis, possibilitando a formação de complexos com vários metais de transição.⁷⁵ Além disso, a adição de um anel heteroaromático nas posições R₁ ou R₂ obtendo-se, como por exemplo, os derivados 2-acetilpiridina (Figura 1.9 B), possibilita a coordenação de forma tridentada.

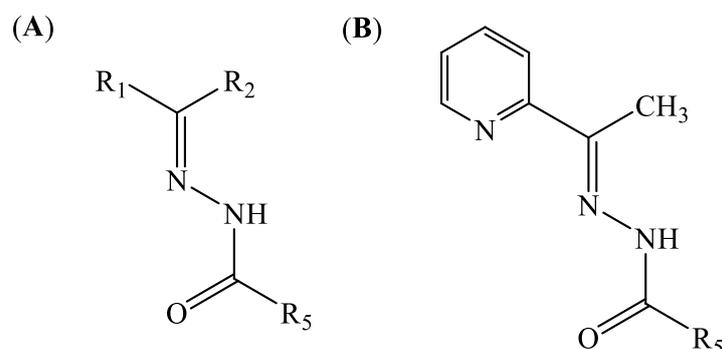


Figura 1.9 Estrutura geral de acil hidrazonas (A) e do derivado 2-acetilpiridinahidrazona (B).

R₁, R₂ e R₅ = grupos alquil ou aril.

Tendo em vista que a coordenação a um centro metálico pode resultar em um aumento da atividade biológica de ligantes tais como hidrazonas, a obtenção de novos complexos com esses ligantes tem sido de grande interesse dos pesquisadores.

Complexos de cobalto(II), cobre(II), zinco(II) e níquel(II) com acil hidrazonas derivadas de isatina apresentaram atividade significativa contra bactérias *Gram*-negativas *Haemophilus influenzae*.⁷⁶ A atividade antimicrobiana de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina aumentou significativamente após a coordenação aos íons metálicos cobre(II),⁷⁷ estanho(IV),⁷⁸ antimônio(III)⁷⁹ e bismuto(III).⁸⁰

Hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de cobre(II)⁸¹ mostraram-se altamente citotóxicos contra as células de glioma U-87 e T-98, com valores de CI₅₀ (concentração que inibe 50 % da viabilidade celular) na faixa de 13,8 – 67,6 μM. Os complexos

⁷⁵ P. G. Avaji, C. H. V. Kumar, S. A. Patil, K. N. Shivananda, C. Nagaraju, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3552.

⁷⁶ M. C. Rodríguez-Argüelles, R. Cao, A. M. García-Deibe, C. Pelizzi, J. Sanmartín-Matalobos, F. Zani, *Polyhedron* 28 (2009) 2187.

⁷⁷ A. A. R. Despaigne, F. B. da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron* 38 (2012) 285.

⁷⁸ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. Da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247.

⁷⁹ E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. da Silva, I. P. Ferreira, J. A. Takahashi, H. Beraldo, *Polyhedron* 97 (2015) 30.

⁸⁰ I. P. Ferreira, E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, J. P. Ramos, L. B. Marques, P. H. D. Prazeres, J. A. Takahashi, E. M. Souza-Fagundes, W. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 2988.

⁸¹ A. A. R. Despaigne, J. G. da Silva, P. R. da Costa, R. G. dos Santos, H. Beraldo, *Molecules* 19 (2014) 17202.

de cobre(II) mostraram-se mais ativos do que as hidrazonas correspondentes contra células U87 (3,02 – 5,95 μM).

Hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de bismuto(III) mostraram-se altamente citotóxicos frente a células de carcinoma colorretal HCT-116. Esses compostos apresentaram uma atividade 3 vezes maior frente células HCT-116 cultivadas no modelo 3D *soft-agar* do que quando as células foram cultivadas em monocamada (2D).⁸⁰

1.6.2 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (Figura 1.7 C, página 16) são ligantes bidentados conhecidos como *N,S*-doadores. A coordenação através dos átomos de enxofre e nitrogênio N1 ou N2 leva a formação de anéis quelatos de cinco ou quatro membros, respectivamente, sendo este último menos comum.⁸² Tiossemicarbazonas com substituintes heteroaromáticos ligados ao carbono da imina (R_1), como por exemplo piridina, possuem um sítio de coordenação adicional e normalmente coordenam-se de forma tridentada pelo sistema NNS. A adição de grupos heteroaromáticos nessa posição possibilita a deslocalização eletrônica na cadeia da tiossemicarbazona facilitando a coexistência do equilíbrio tautomérico tiona/tiol.⁶⁵ Sendo assim, tiossemicarbazonas ligam-se ao íon metálico de forma neutra (tiona) ou desprotonada (tiolato).

Esses compostos também apresentam isômeros configuracionais *E* e *Z* em relação à ligação C=N (Figura 1.10) dependendo da posição e da natureza do grupo substituinte. No caso de 2-benzoilpiridina-*N*(4)-feniltiossemicarbazona (onde $R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$) a proporção de isômeros em solução é *Z* (70 %) e *E* (30 %).^{83,84} Já no caso de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (onde $R_2 = \text{CH}_3$) o isômero mais abundante é o isômero *E* (95 %).^{85,86}

⁸² R. Prabhakaran, R. Huang, S. V. Renukadevi, R. Karvembu, M. Zeller, K. Natarajan, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 2547.

⁸³ A. P. Rebolledo, G. M. de Lima, L. N. Gambi, N. L. Speziali, D. F. Maia, C. B. Pinheiro, J. D. Ardisson, M. E. Cortes, H. Beraldo, *Appl. Organometal. Chem.* 17 (2003) 945.

⁸⁴ D. X. West, N. M. Kozub, G. A. Bain, *Transit. Met. Chem.* 21 (1996) 52.

⁸⁵ 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.

⁸⁶ 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.

A atividade antimicrobiana de complexos de tiossemicarbazonas com metais tais como mercúrio(II),⁹⁶ manganês(II),⁹⁷ cobre(II),⁹⁸ estanho(IV),⁸⁶ e gálio(III)⁹⁹ tem sido relatada na literatura.

Tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas vêm sendo muito estudadas como agentes antitumorais.¹⁰⁰ A Triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona), composto em fase clínica II, apresenta atividade citotóxica contra diversas células tumorais.¹⁰¹ Um mecanismo proposto seria a inibição da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), uma enzima envolvida na biossíntese do ADN. Em uma das subunidades que compõe a RDR existem dois íons ferro(III) ligados entre si através de uma ponte μ -oxo e um radical livre tirosila.¹⁰² Sendo assim, tem sido proposto que o mecanismo de ação envolveria a coordenação da tiossemicarbazona ao ferro(III), seguida da redução do complexo de ferro(III) ao de ferro(II) por um tiol celular e reoxidação do complexo de ferro(II) ao complexo de ferro(III), com a liberação de um elétron que inativaria o radical livre da enzima.¹⁰³

2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazona (H₂Ac₄oClPh) e seus complexos de paládio(II), platina(II), bismuto(III), antimônio(III) e ouro(III) foram altamente citotóxicos frente células de carcinoma mamário (MCF-7) e colorretal (HT-29). A atividade citotóxica dos complexos de antimônio(III) e ouro(III) está relacionada com a capacidade dos mesmos em inibir a atividade enzimática de tiorredoxina redutase (TrxR) e glutatona redutase (GR). Já os complexos de paládio(II), platina(II) e bismuto(III) inibiram a atividade somente da enzima TrxR. A afinidade desses complexos pelo alvo biológico TrxR sugere a ligação do íon metálico ao resíduo selenol (SeH) no sítio ativo da enzima.¹⁰⁴

⁹⁶ E. Bermejo, R. Carballo, A. Castiñeiras, R. Dominguez, C. M. Maichle-Mössmer, J. Strähle, D. X. West, *Polyhedron* 18 (1999) 3695.

⁹⁷ U. El-Ayaan, M. M. Youssef, S. Al-Shihry, *J. Mol. Struct.* 936 (2009) 213.

⁹⁸ I. C. Mendes, J. P. Moreira, N. L. Speziali, A. S. Mangrich, J. A. Takahashi, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1571.

⁹⁹ J. G. da Silva, L. S. Azzolini, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2301.

¹⁰⁰ A. Y. Louie, T. J. Meade, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2711.

¹⁰¹ R. A. Finch, M. Liu, S. P. Grill, W. C. Rose, R. Loomis, K. M. Vasquez, Y. Cheng, A. C. Sartorelli, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 983.

¹⁰² G. Nocentini, *Critical Rev. Oncol. Hematol.* 22 (1996) 89.

¹⁰³ R. H. U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 267.

¹⁰⁴ G. L. Parrilha, K. S. O. Ferraz, J. A. Lessa, K. N. de Oliveira, B. L. Rodrigues, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 537.

1.7 Objetivos do presente trabalho

Tendo em vista o amplo perfil farmacológico apresentado por hidrazonas e tiossemicarbazonas, a obtenção e avaliação das atividades biológicas de complexos de rênio(I) e cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina constitui uma estratégia para aumentar a atividade farmacológica desses ligantes.

A atividade antiproliferativa de complexos de rênio(I) contendo o grupo *fac*-[Re(CO)₃]⁺ tem sido pouco explorada na literatura. Sendo assim, complexos de rênio(I) contendo o grupo *fac*-[Re(CO)₃]⁺ e hidrazonas foram sintetizados e testados frente a células cancerígenas. A obtenção de complexos de rênio é ainda relevante ao considerar-se que os mesmos, uma vez que apresentem atividade citotóxica, poderiam ser utilizados para obtenção de complexos análogos com os radionuclídeos ^{186,188}Re e ^{99m}Tc, com potenciais para serem aplicados na radioterapia e como agentes de imagem SPECT. Desse modo, além de suas propriedades intrínsecas, os complexos de rênio têm grande valor como modelos de radiofármacos.

Complexos de cobalto(III) com ligantes antineoplásicos têm sido utilizados na formulação de pró-drogas biorredutíveis. Sendo assim, a obtenção de complexos de cobalto(III) como uma estratégia de vetorização dos ligantes para tumores constitui um dos objetivos desse trabalho. Para tanto, a ação citotóxica dos complexos frente a diferentes linhagens de células leucêmicas e de tumores sólidos foi investigada. A avaliação da seletividade dos complexos de cobalto(III) para região de hipóxia foi feita por meio de estudos eletroquímicos e de redução com ditionito de sódio. A seletividade desses complexos para região de hipóxia foi também avaliada por meio de estudos de citotoxicidade dos mesmos frente a células de carcinoma mamário MCF-7 cultivadas no modelo tridimensional *soft-agar*, o qual tem sido utilizado para mimetizar células em hipóxia.

Considerando-se que no desenvolvimento de candidatos a fármacos antitumorais é de interesse conhecer outras bioatividades que os compostos possam eventualmente apresentar, foi realizado igualmente um estudo da atividade desses compostos frente a diferentes cepas de fungos e contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas.

Finalmente, realizou-se um estudo de interação dos compostos com a albumina sérica humana (ASH), uma proteína abundante do plasma sanguíneo, com importantes funções fisiológicas e que possui capacidade de se ligar a uma variedade de drogas direcionando-as para um determinado sítio, com diminuição dos efeitos colaterais das mesmas.

De forma resumida, os objetivos específicos do presente trabalho compreendem:

- (a) Sintetizar e caracterizar complexos de rênio(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina;**
- (b) Sintetizar e caracterizar complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina;**
- (c) Avaliar a atividade citotóxica dos complexos de rênio(I) frente às células NCI-H460 (carcinoma pulmonar humano) e células não-tumorais HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana);**
- (d) Avaliar o mecanismo de ação dos complexos de rênio(I) frente a células NCI-H460;**
- (e) Avaliar a atividade antimicrobiana dos complexos de rênio(I) e cobalto(III) frente bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, e fungos do gênero *Candida*;**
- (f) Avaliar a atividade citotóxica dos complexos de cobalto(III) frente células leucêmicas (HL60, Jurkat e THP-1), tumores sólidos (MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116) e células não-tumorais (Vero), cultivadas no modelo monocamada (2D);**
- (g) Avaliar a atividade citotóxica dos complexos de cobalto(III) frente às células de carcinoma mamário MCF-7 cultivadas no modelo tridimensional *soft-agar*;**
- (h) Realizar estudos eletroquímicos dos complexos de cobalto(III);**
- (i) Avaliar a interação dos complexos de cobalto(III) com o redutor ditionito de sódio (Na₂S₂O₄);**
- (j) Realizar estudos de interação dos complexos de cobalto(III) e rênio(I) com ASH;**

Capítulo 2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais, equipamentos e procedimentos

2.1.1 Reagentes e solventes

As reações foram feitas utilizando reagentes com alto grau de pureza e solventes *P.A.* Os reagentes e os solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Merck, SyntheVetec). Os solventes deuterados foram de procedência CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

2.1.2 Medidas de massa

As medidas de massa foram feitas em uma balança analítica Gehaka - AG200, com sensibilidade de 0,0001 g, ou em uma balança Mettler-AE163, com sensibilidade de 0,00001g.

2.1.3 Temperatura de fusão

As faixas de temperatura de fusão (ou decomposição) dos compostos foram determinadas utilizando-se o equipamento Mettler-FP90, dotado de célula de aquecimento Mettler-FP82HT e Microscópio Olympus CH-2 com controlador digital de temperatura.

2.1.4 Análise elementar de CHN

As análises elementares foram realizadas 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, PerkinElmer.

2.1.5 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas na Termobalança Shimadzu-TGA50H, a qual encontra-se alocada no Laboratório de Análise Térmica do Dep. de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de N₂, com razão de aquecimento de 5 °C min⁻¹. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 750 °C.

2.1.6 Análise condutimétrica

O equipamento utilizado nas medidas de condutividade molar eletrolítica (Λ_M) foi um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante 0,088 cm⁻¹. As medidas foram feitas a partir de soluções dos

compostos (1,0 mM), utilizando-se dimetilformamida (DMF) como solvente. Os resultados foram analisados tomando como base os dados da Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração 1,0 mM (DMF)

Tipo de eletrólito	Λ_M ($\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$)	
	J. W. Geary ¹	R. G. Velho ²
Não-eletrólito	< 65	< 37
1:1	65 - 90	37 - 122
2:1	130 - 170	90 - 194
3:1	200 - 240	201 - 284

2.1.7 Medidas de susceptibilidade magnética

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas no laboratório 290 utilizando uma balança de susceptibilidade magnética JM - Alfa Aesar – A Johnson Mathey Company (13693).

2.1.8 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, alocado no Dep. de Química da UFMG. Os espectros foram registrados na região 4000-400 cm^{-1} empregando pastilhas de KBr.

2.1.9 Espectroscopia eletrônica

Os espectros de absorção nas regiões do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) foram obtidos nos espectrofotômetros UV-2401PC (Shimadzu) e Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies). Os espectros de fluorescência foram registrados no espectrofluorímetro CARY Eclipse-(FL1006m016)-VARIAN (Agilent Technologies), alocado no Dep. de Química da UFMG, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

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

² R. G. Velho, Medida de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2006.

2.1.10 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados nos espectrômetros Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) e Bruker DPX-200 (200 MHz) localizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Dep. de Química da UFMG. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO- d_6 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna, em tubos de 5 mm de diâmetro externo. Em alguns casos, foi utilizado como referência interna o sinal residual do próprio solvente deuterado. Os experimentos RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) e mapas de contorno COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*) e HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*, $^{13}C-^1H$ J) foram obtidos a 25 °C.

2.1.11 Estudos eletroquímicos

Medidas eletroquímicas foram realizadas no laboratório do prof. Paulo J. S. Barbeira (Dep. de Química - UFMG) utilizando-se um potenciostato μ -AutoLabType II. O sistema de eletrodos utilizado foi um arranjo convencional de três eletrodos: contra-eletródo de platina, eletródo de referência de Ag/AgCl e eletródo de trabalho de carbono vítreo. Antes de cada medida experimental, o eletródo de trabalho foi previamente polido utilizando-se Alumina N° 2 (óxido de alumínio – granulometria 0,3 μm). Em seguida, esse eletródo foi ativado utilizando-se uma solução de Na₂SO₄ (0,5 M) em água desionizada. Foram preparadas soluções dos compostos (0,5 mM) em acetonitrila espectroscópica (99,9 % Merck), contendo o eletrólito suporte perclorato de tetrabutilamônio ($\geq 99,0\%$ Sigma Aldrich) ([NBu₄][ClO₄], 0,1 M). As medidas eletroquímicas foram realizadas em atmosfera de nitrogênio, a uma faixa de potencial de 2,00 a -2,00 V, com velocidades de varredura de 500, 250, 100, 75, 50 e 25 mV s⁻¹. O experimento foi realizado a temperatura ambiente. O par redox Fc/Fc⁺ (Fc = ferroceno; 0,400 V *versus* eletródo normal de hidrogênio, ENH) foi utilizado como padrão interno para conversão do potencial medido em volts *versus* Ag/AgCl para volts *versus* ENH.^{3,4}

2.1.12 Difração de raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos (**1**, **2a**, **3a** e **4a**) foram determinadas por meio das medidas realizadas pelo Prof. Dr. Bernardo Lages Rodrigues, no LabCri

³ 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.

⁴ G. Gritzner, J. Kuta, *Pure Appl. Chem.* 56 (1984) 461.

(Laboratório de Cristalografia da UFMG), utilizando-se um difratômetro Oxford GEMINI. A estrutura cristalográfica do complexo (**8a**) foi determinada pelo aluno de doutorado Ryan Clarke orientado pelo Prof. Dr. Tim Storr. As medidas foram realizadas em um difratômetro Bruker APEX II Duo da Simon Fraser University - SFU, Canadá. Os detalhes e as condições experimentais de cada medida são descritos nos capítulos correspondentes.

2.1.13 Espectrometria de massas de alta resolução

As análises de ESI-MS (*Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*) foram realizadas no laboratório de Espectrometria de Massas (UFMG) utilizando um espectrômetro de massas Shimadzu LCMS-IT-TOF (225-07100-34) operando nos modos positivo e negativo. As condições experimentais foram: temperatura do bloco de aquecimento 250 °C, temperatura de dessolvatação 200 °C, detector de voltagem 1,76 kV e voltagem no capilar 4,5 kV. Os compostos foram dissolvidos em metanol e introduzidos no equipamento por injeção direta. A ionização foi realizada a partir do emprego de fonte de electrospray (ESI), com acumulador íon trap (IT). O analisador de massas empregado foi *time of flight* (TOF). Os espectros de massas foram adquiridos em um intervalo de m/z 100-1000.

2.1.14 Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se o potenciômetro Marte MB-10, equipado com eletrodo de vidro combinado de Ag/AgCl, calibrado com tampões de pH 4,00 e 7,00.

2.1.15 Estabilidade dos compostos

Os estudos de estabilidade dos compostos foram realizados utilizando-se o espectrofotômetro UV-2401PC (Shimadzu) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os espectros eletrônicos foram obtidos com o curso do tempo para soluções dos compostos de concentração na ordem de 10^{-4} a 10^{-5} M em tampão 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl (5 % DMSO) ou DMSO puro.

2.2 Sínteses de ligantes e complexos

2.2.1 Sínteses de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Foram preparados os compostos 2-acetilpiridina-fenilhidrazona (H2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenilhidrazona (H2Ac p ClPh) e 2-acetilpiridina-*para*-

nitrofenilhidrazona (H2Ac p NO₂Ph). Estas foram obtidas a partir da reação de condensação de 2-acetilpiridina com a hidrazida desejada, conforme descrito na literatura.⁵⁻⁸

Para a obtenção das hidrazonas H2AcPh, H2Ac p ClPh e H2Ac p NO₂Ph, em um balão de fundo redondo, 10 mmol de 2-acetilpiridina foram misturados com quantidade equimolar de benzoidrazida, 4-clorobenzoidrazida e 4-nitrobenzoidrazida, respectivamente, em metanol (30 ml). Em seguida, duas gotas de ácido acético glacial foram adicionadas à mistura reacional, a qual foi mantida em refluxo sob constante agitação magnética por 7 h. O sólido obtido foi filtrado em papel de filtro sob vácuo e lavado com metanol e éter etílico, e secado em dessecador de vidro contendo sílica-gel. As hidrazonas de coloração branca (H2AcPh e H2Ac p ClPh) ou bege (H2Ac p NO₂Ph), foram obtidas com rendimento de 89 a 90 % em relação à hidrazida de partida. Os compostos foram caracterizados por meio de seus espectros de RMN (¹H e ¹³C) e infravermelho.

2.2.2 Sínteses de tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina

As tiossemicarbazonas já estão descritas na literatura⁹⁻¹² e a obtenção das mesmas ocorreu por meio de duas etapas.

Na primeira etapa foram obtidos os precursores *N*(3)-feniltiossemicarbazida, *N*(3)-*para*-clorofeniltiossemicarbazida, *N*(3)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazida, *N*(3)-*para*-nitrofeniltiossemicarbazida e *N*(3)-*orto*-nitrofeniltiossemicarbazida. Estes precursores foram preparados em balão de fundo redondo reagindo-se 10 mmol do isotiocianato apropriado com 13 mmol (30 % de excesso) de hidrazina monoidratada em metanol (30 mL). A mistura foi mantida em banho de gelo, sob agitação magnética constante por 24 h. O produto de coloração branca (Ph, *p*ClPh e *o*ClPh-tiossemicarbazidas) ou amarela (*p*NO₂Ph e *o*NO₂Ph-tiossemicarbazidas) foi filtrado em papel de filtro sob vácuo, lavado com metanol e éter etílico e secado em dessecador de vidro contendo sílica-gel. As tiossemicarbazidas foram

⁵ T. E. Khalil, L. Labib, M. F. Iskander, *Polyhedron* 13 (1994) 2569

⁶ J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D. N. Deobagkar, C. E. Anson, A. Powell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 51.

⁷ S. Choudhary, J. R. Morrows, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4096.

⁸ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. Da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247.

⁹ D. L. Klayman, J. F. Bartosevich, T. S. Griffin, C. J. Mason, J. P. Scovill, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 855.

¹⁰ E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Domínguez, R. Carballo, C. Maichle-Mossmer, J. Strahle, D. X. West, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 625 (1999) 961.

¹¹ D. X. West, J. J. Ingram III, N. M. Kozub, G. A. Bain, A. E. Liberta, *Transit. Met. Chem.* 21 (1996) 213.

¹² 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.

obtidas com rendimento de 79 a 89 % em relação ao isotiocianato de partida. Análises realizadas por infravermelho e temperatura de fusão confirmam a obtenção das mesmas.

Na segunda etapa, foram preparados os compostos 2-acetilpiridina-*N*(4)-feniltiossemicarbazona (H2Ac4Ph), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*p*ClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*ClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*p*NO₂Ph) e 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*NO₂Ph). Em um balão contendo 10 mmol de 2-acetilpiridinahidrazona e 30 ml de metanol foi adicionada quantidade equimolar da tiossemicarbazida apropriada. A mistura reacional permaneceu 6 a 7 h sob refluxo, sendo necessária a adição de duas gotas de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). As tiossemicarbazonas possuem coloração amarela e foram obtidas com rendimento de 89 – 90 % em relação à tiossemicarbazida de partida. Análises realizadas por RMN (¹H e ¹³C) e infravermelho confirmam a obtenção desses compostos.

2.2.3 Sínteses dos complexos de rênio(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Foram obtidos três complexos de rênio(I) com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina: [ReCl(CO)₃(H2AcPh)](1), [ReCl(CO)₃(H2Ac*p*ClPh)]·0,5C₇H₈ (2) e [ReCl(CO)₃(H2Ac*p*NO₂Ph)]·0,5C₇H₈ (3).

Os complexos de rênio(I) foram preparados a partir da reação de 0,5 mmol da hidrazona apropriada com 0,5 mmol do pentacarbonilclororênio(I), [ReCl(CO)₅], em tolueno (10 mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética e refluxo durante 2 h obtendo-se um precipitado alaranjado que foi filtrado em papel de filtro sob vácuo, lavado com tolueno e éter, e secado em dessecador de vidro contendo sílica-gel. Os compostos foram obtidos com rendimento em torno de 84 – 90 %. Os mesmos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar e por meio dos seus espectros de infravermelho e RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, DEPT 135, COSY e HMQC.

Cristais dos complexos [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (1) e [ReCl(CO)₃(H2Ac*p*NO₂Ph)]·DMSO (3a) foram obtidos após a recristalização dos compostos a temperatura ambiente em DMSO-*d*₆. Cristais do complexo [ReCl(CO)₃(H2Ac*p*ClPh)]·DMSO (2a) foram obtidos após a recristalização do composto por meio de resfriamento lento (geladeira) em DMSO/CH₃OH (1:2).

2.2.4 Sínteses dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Foram obtidos três complexos de cobalto com as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina: $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**5**) e $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (**6**).

As sínteses dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas foram realizadas na presença de oxigênio. Em um balão de fundo redondo contendo 2 mmol da hidrazona apropriada (10 mL de metanol), foram adicionados, gota a gota, uma solução preparada com 1 mmol de cloreto de cobalto(II) hexahidratado, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em 10 ml de metanol. A solução ficou sob agitação magnética e refluxo durante 3 h. Em seguida, o volume foi reduzido (rotavapor) para cerca de 10 mL obtendo-se um precipitado marrom, que foi lavado com metanol e éter etílico, e secado em dessecador de vidro contendo sílica-gel. Os compostos foram obtidos com rendimento em torno de 24 a 44 %. Os complexos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar, medidas de susceptibilidade magnética e por meio dos seus espectros de infravermelho e RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT 135, COSY e HMQC.

Cristais do complexo $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{ClO}_4\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}\cdot 0,5\text{DMSO}$ (**4a**) foram obtidos a partir da tentativa de síntese do complexo $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{2AcPh})](\text{ClO}_4)_2$ [TPA = *tris*(2-piridilmetil)amina] por meio da reação da hidrazona H_2AcPh com $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$, em metanol.¹³ No entanto, a caracterização (microanálises, espectros de infravermelho e RMN de ^1H) do produto indicou a formação do complexo $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{ClO}_4$. Os cristais de **4a** foram obtidos a partir da solução do mesmo em DMSO- d_6 .

2.2.5 Sínteses dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Foram obtidos cinco complexos de cobalto com as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina: $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl}\cdot \text{CH}_3\text{OH}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**7**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4p\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4o\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**9**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4p\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) e $[\text{Co}(\text{2Ac}4o\text{NO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**). Destes cinco, apenas o complexo (**7**) não é inédito.¹⁴

As reações de obtenção dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas foram realizadas na presença de oxigênio. Em um balão de fundo redondo contendo 2 mmol da

¹³ T. W. Failes, C. Cullinane, C. I. Diakos, N. Yamamoto, J. G. Lyons, T. W. Hambley, *Chem Eur. J.* 13 (2007) 2974.

¹⁴ C. G. Oliveira, P. I. S. Maia, M. Miyata, F. R. Pavan, C. Q. F. Leite, E. T. De Almeida, V. M. Deflon, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 1848.

tiossemicarbazona apropriada, dissolvida em 10 mL de metanol, foram adicionados, gota a gota, 10 mL de solução metanólica contendo 1 mmol de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução ficou sob agitação magnética e refluxo durante 3 h. Os complexos $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**) e $[\text{Co}(\text{2Ac4pNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) foram isolados como sólidos de coloração marrom após a redução do volume da solução para 10 mL utilizando-se rotavapor. Os complexos $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl} \cdot \text{CH}_3\text{OH} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**7**), $[\text{Co}(\text{2Ac4oClPh})_2]\text{Cl} \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**9**) e $[\text{Co}(\text{2Ac4oNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**) foram isolados após evaporação lenta a temperatura ambiente. Os compostos foram filtrados em papel de filtro sob vácuo e lavados com metanol e éter etílico, e secados em dessecador de vidro contendo sílica-gel.

Os compostos foram obtidos com rendimento em torno de 62 a 86 %. Os mesmos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar, medidas de susceptibilidade magnética e por meio dos seus espectros de infravermelho e RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT 135, COSY e HMQC.

Cristais do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl} \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (**8a**) foram obtidos após a recristalização do composto em solução metanólica a temperatura ambiente.

A tentativa de síntese do complexo com tiossemicarbazona contendo o co-ligante TPA, $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{2Ac4Ph})](\text{ClO}_4)_2$, também foi realizada por meio da reação da tiossemicarbazona H2Ac4Ph com $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$, em metanol.¹³ A caracterização (microanálises, espectros de infravermelho e RMN de ^1H) do produto indicou a formação do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{ClO}_4$.

2.3 Ensaios biológicos

2.3.1 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de rênio(I)

Estudos com o intuito de avaliar a atividade antiproliferativa dos complexos (**1-3**) foram realizados em colaboração com o Dr. Adilson Kleber Ferreira (Laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Ciências Biomédicas - USP). Os compostos foram testados frente às células NCI-H460 (carcinoma pulmonar humano) e frente às células não-malignas HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana). Juntamente com os complexos foram testados também o sal precursor $[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$ e as hidrazonas livres.

As avaliações de apoptose, potencial de membrana mitocondrial e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês) foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA). Um total de 10 000 eventos por amostra foi analisado e a intensidade média de fluorescência foi registrada. O *software* FlowJo (TreeStar, CA, USA) foi utilizado para análise dos dados.

2.3.1.1 Linhagens celulares e condições de cultura

As células NCI-H460 e HUVECs foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MA, USA). As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (criado pelo *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

2.3.1.2 Avaliação da citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) a formazan¹⁵ para determinar o valor da concentração que inibe 50 % da viabilidade celular (CI₅₀) de cada complexo. O MTT é um corante amarelo que, na presença de células vivas, é reduzido formando o formazan, um produto de coloração roxo insolúvel em água.¹⁶ As células NCI-H460 e HUVECs foram semeadas em placas de 96 poços com uma concentração de 1 x 10⁴ células por poço. As células foram incubadas por 2 h. Em seguida, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (0 a 200 µM) por 24 h. Após o intervalo de incubação, MTT (5 mg mL⁻¹ em tampão fosfato salino - PBS, 1x) foi adicionado em cada poço. Após mais 3 h de incubação, as placas foram centrifugadas e os cristais de formazan formados por células viáveis foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. As densidades ópticas (DO) das soluções resultantes foram medidas a 538 nm usando o leitor de microplacas *VERSAmax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA*. A viabilidade celular (%) relativa ao grupo controle (células NCI-H460 não tratadas) foi calculada usando a Equação 2.1, na qual DOT representa os valores de DO do grupo de tratamento e DOC representa os valores de DO do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular / \%} = (\text{DOT} / \text{DOC}) \times 100$$

Equação 2.1

2.3.1.3 Avaliação de morte celular por Anexina V-FITC / Iodeto de Propídeo

A ocorrência de apoptose foi determinada utilizando o kit *FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis* (Invitrogen Inc., UK. NCI-H460). O teste consiste na dosagem de fosfatidilserina exposta na superfície celular. A proteína de ligação, Anexina V, conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), foi utilizada para marcar fosfatidilserina. As células também foram

¹⁵ T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55.

¹⁶ J. A. Plumb, R. Milroy, S.B. Kaye, *Cancer Res.* 49 (1989) 4435.

marcadas com iodeto de propídeo (IP), o que permite a discriminação entre as células apoptóticas e necróticas.

As células foram cultivadas em placas de 12 poços (5×10^5 células por poço) e incubadas. Após a incubação, as células foram tratadas por 3 ou 6 h com 10 μM dos complexos (2) ou (3). Em seguida, as células foram ressuspensas com tampão de ligação para anexina V e coradas com 1,5 mL de anexina V-FITC e 0,4 mL da solução de iodeto de propídeo ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em tampão por 30 min, a 4 °C e na ausência de luz.

2.3.1.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

As células NCI-H460 (5×10^5 células por poço) foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas por 12 h com 5, 10 ou 20 μM dos complexos (2) ou (3). Após o tratamento, as células foram recolhidas, lavadas uma vez com PBS e coradas com a sonda tetrametil rodamina metil éster (TMRE) por 15 min a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS/ASB (albumina sérica bovina) 0,5 % e mantidas a 4 °C durante as medições.

2.3.1.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção intracelular de ROS foi avaliada usando a sonda fluorescente dihidroetídeo (DHE). As células NCI-H460 foram semeadas em placas de 12 poços (5×10^5 células por poço) e após aderência celular, estas foram tratadas durante a noite com 5, 10 ou 20 μM dos complexos (2) ou (3). Em seguida, as células foram descoladas com tripsina 0,5 %, lavadas com PBS/ASB 0,5 % e incubadas com 5 μM de DHE a 37 °C por 15 min.

2.3.1.6 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram apresentados como média \pm DP (desvio padrão). Os valores de CI_{50} foram calculados pela plotagem da porcentagem de inibição de viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, *versus* a concentração logarítmica dos compostos. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste “t de Student” para comparar grupos de amostras. O teste ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni, foram utilizados para determinar a diferença entre grupos múltiplos. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* Prism versão 5.04 (LaJolla, CA, USA).

2.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos complexos de cobalto(III)

Os testes de atividade citotóxica dos complexos foram realizados no Departamento de Fisiologia da UFMG, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Elaine Maria de Souza Fagundes.

2.3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: HL60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia linfócitos T), THP-1 (leucemia monocítica), MCF-7 e MDA-MB-231 (carcinoma mamário), HCT-116 (carcinoma colorretal) e Vero (rim de macaco verde, usada como modelo de células não tumorais). Células HL60, Jurkat e THP-1 foram fornecidas pelo Dr. Gustavo Amarante-Mendes (USP). Células MCF-7 foram fornecidas pelo Dr. Alfredo Goes (UFMG). Células HCT-116 foram compradas da ATCC. Células Vero foram fornecidas por Erna Kroon (UFMG).

Todas as células foram mantidas no meio de cultura RPMI (*Roosevelt Park Memorial Institute*) 1640 ou DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (GIBCO BRL, *Grand Island, NY*) enriquecido com 2 mM de L-glutamina e 10 % (para células leucêmicas) ou 5 % (para células aderentes) de SFB. Todas as células foram mantidas sob uma atmosfera de 5 % CO₂ / 95 % ar, a 37 °C por 24 h. O meio de cultura foi examinado regularmente e trocado duas vezes por semana.

2.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade

As suspensões de células leucêmicas Jurkat (1 x 10⁵ células/poço) e HL60 (1 x 10⁴ células/poço), e de tumores sólidos HCT-116, MCF-7 e MDA-MB 231 (1 x 10⁴ células/poço) foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ para estabilização das células antes da adição dos compostos a serem testados. Após a estabilização, todas as células foram incubadas com os compostos (10 µM) por 48 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade. Paralelamente, foram utilizados etoposídeo e cisplatina (10 µM) como controles positivos e DMSO (concentração de 0,5 %) como controle negativo. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTT. Compostos que inibiram a proliferação mais do que 50 % foram selecionados para a determinação do CI₅₀. Os valores de CI₅₀ foram determinados numa faixa de 100 a 0,001 µM. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata para cada linhagem celular testada.

2.3.2.3 Teste de viabilidade celular *in vitro*

A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio MTT. Faltando 4 h para o final do período de incubação das culturas celulares com os diferentes compostos, 20 µL de solução de MTT (5 mg mL⁻¹ em PBS) foram adicionados a cada poço. Após 4 h, o sobrenadante foi retirado a vácuo e a cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl (0,04 M) em isopropanol para a solubilização dos cristais de formazan. Os valores de densidade óptica (DO) foram medidos em um espectrofotômetro a 595 nm. Juntamente com as placas-teste (DO_{teste}) foram feitas as seguintes placas-controle: controle dos compostos (DO_{composto} - meio de cultura na presença dos compostos) e controle do meio de cultura (DO_{meio} - apenas meio de cultura). Os valores de porcentagem de inibição de proliferação celular dos compostos em comparação com as células tratadas com DMSO (0,5%) foram obtidos por meio da Equação 2.2.

$$\% \text{ Inibição da proliferação} = [(DO_{\text{teste}} - DO_{\text{composto}}) / (DO_{\text{DMSO}(0,5\%)} - DO_{\text{meio}})] \times 100$$

Equação 2.2

Interações entre os compostos e o meio de cultura foram estimados com base nas variações entre as placas contendo somente meio de cultura e as placas contendo meio de cultura mais os compostos testados para evitar falso-positivo ou falso-negativo em relação ao controle.¹⁷

2.3.2.4 Teste de viabilidade celular em *soft-agar* (3D)

O teste de viabilidade em *soft-agar* foi adaptado do procedimento descrito na literatura.¹⁸ Uma camada base de ágar 0,6% contendo DMEM com 10% de SFB foi adicionada aos poços da placa de cultura. Células MCF-7 foram plaqueadas em uma densidade de 5.000 células por poço em um meio independente de ancoragem (ágar 0,4% contendo DMEM com 10% de SFB). Após 24 h de incubação, os compostos (solução 10 µM em PBS) foram adicionados e incubados por mais 7 dias. A concentração final do composto em cada poço foi de 1 µM. Ao término do período de incubação, foram adicionados 20 µL de rezasurina (0,6 mM) por poço. Após 6 h, a densidade óptica foi medida a 570 e 600 nm. Poços sem células, com os compostos, foram usados como branco. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da proliferação comparados com o controle DMSO (0,5%).

¹⁷ E. Ulukaya, M. Colakogullari, E. J. Wood, *Chemotherapy* 50 (2004) 43.

¹⁸ S. N. Anderson, D. L. Towne, D. J. Burns, U. J. Warrior, *Biomol. Screen.* 12 (2007) 938.

2.3.3 Testes de atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados em nosso laboratório e no laboratório da Prof^ª. Dr^ª. Jacqueline Aparecida Takahashi (Dep. Química, UFMG). Todos os materiais utilizados durante a manipulação dos microrganismos foram esterilizados em autoclave vertical Fanen (415/3 – J03610) ou Phoenix (AV30 - 15042). Os testes foram realizados em capelas de fluxo laminar VECO (JLF 912 – FL 5799) ou Pachane (PA050/02 – 099,06 ou PA610 – 103,09). Para a determinação da concentração do inóculo foram utilizados os espectrofotômetros BIOSPECTRO SP-22 ou UV-2401 PC Shimadzu. As culturas fúngicas e bacterianas foram incubadas em estufa Quimis Q-(316,12 – 807,131) ou Tecnal (TE-392/2). A leitura das absorbâncias do teste de microdiluição foi realizada no equipamento ELISA (*Thermoplate-TP-READER*).

2.3.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método da macrodiluição

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados em nosso laboratório utilizando-se o método de macrodiluição em série para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).¹⁹ Os testes de sensibilidade foram realizados seguindo os padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).²⁰ Foram utilizadas cepas da coleção ATCC.

A atividade antibacteriana dos complexos de cobalto(III) e rênio(I) foi avaliada contra bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12220) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As cepas das bactérias foram inoculadas em caldo *Mueller Hinton* (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) ou *Brain Heart Infusion* (*S. epidermidis* e *E. faecalis*) e incubadas a 37 °C por 18 a 24 h.

A concentração do inóculo (10^8 unidades formadoras de colônia - UFC) foi determinada por meio da medida da absorção do mesmo na região do visível (530 e 625 nm) devendo fornecer um valor de absorbância de 0,08 e 0,1, respectivamente. O inóculo (100 µL) foi diluído em 9,9 mL de caldo *Mueller Hinton* (MH) ou *Brain Heart Infusion* (BHI) de forma a obter-se uma concentração de 10^6 UFC.

Soluções estoque dos compostos em DMSO (2 mg mL⁻¹) e soluções trabalho em meio de cultura (0,2 mg mL⁻¹) foram preparadas. O teste foi realizado por meio de diluições

¹⁹ J. Pernak, J. Rogoz, I. Mirska, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 313–320.

²⁰ *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.

sucessivas da solução trabalho dos compostos em dez tubos contendo 2 mL do caldo apropriado. As concentrações finais dos compostos nos tubos foram de 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 200 μL do inóculo, obtendo-se uma concentração final de 10^5 UFC. A concentração final de DMSO nos tubos de ensaio foi de no máximo 5 %. No caso dos compostos menos ativos o teste foi realizado com uma solução estoque de 10 mg mL^{-1} .

Foram utilizados como controles negativos os fármacos cloridrato de tetraciclina (para *S. aureus* e *P. aeruginosa*) ou ciprofloxacina (para *S. epidermidis* e *E. faecalis*). O controle positivo consistiu de tubos contendo apenas o meio de cultura e o microrganismo de interesse. Os testes foram realizados em triplicata. Após 20 h de incubação a 37 °C foram realizadas as leituras e determinados os valores de CIM dos compostos.

2.3.3.2 Avaliação da atividade antifúngica pelo método da microdiluição

Os testes de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Dep. de Química da UFMG com a supervisão da Prof^a. Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi. O método de microdiluição em placas de 96 poços foi utilizado para a determinação dos valores de CI_{50} , o qual indica a menor concentração do composto capaz de inibir 50 % do crescimento do microrganismo. Foram utilizadas cepas da coleção ATCC, da coleção CBS (*College of Biological Sciences*, USA) e isolado clínico 28.

A atividade antifúngica dos complexos de cobalto(III) e rênio(I) foi avaliada contra fungos *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (isolado clínico 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida tropicalis* (ATCC 750). As cepas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 h.

A concentração do inóculo foi ajustada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm devendo fornecer 74 – 75 % de transmitância. A concentração final do inóculo no teste foi de $4,16 \times 10^3$ células mL^{-1} .

No momento da realização do teste preparou-se uma solução estoque dos compostos em DMSO (12,5 mg mL^{-1}). Em seguida, foi preparada uma solução trabalho através da diluição de 40 μL da solução estoque em 960 μL de meio de cultura BHI. Previamente, realizou-se uma triagem na qual foi avaliada a atividade dos compostos em uma concentração fixa de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Somente os compostos que inibiram o crescimento do microrganismo nessa concentração foram submetidos à determinação do CI_{50} conforme procedimento descrito abaixo. A atividade dos complexos selecionados na triagem foi avaliada na faixa de

concentração de 250 a 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ conforme o procedimento descrito na literatura.²¹ Foram testados também os fármacos nistatina e nitrato de miconazol como controles positivos.

Foram feitas diluições sucessivas dos compostos em placas de 96 poços contendo 100 μL do caldo BHI e em seguida, adicionou-se em cada poço 100 μL do inóculo padronizado. O teste foi realizado em quadruplicata. Juntamente com as placas-teste foram feitas as seguintes placas-controle: controle dos compostos (CC), controle do meio de cultura (CM) e controle do crescimento do fungo (CF). Na placa CC foram adicionados 100 μL de água destilada estéril ao invés de adicionar o inóculo. A placa CM continha apenas 100 μL de BHI e 100 μL de água destilada estéril. Na placa CF continha 100 μL de BHI e 100 μL do inóculo.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. O crescimento do microrganismo é evidenciado pela turvação do meio, sendo este medido em um comprimento de onda fixo (492 nm) utilizando-se o equipamento ELISA. O cálculo da porcentagem de inibição foi feito utilizando a Equação 2.3, na qual EC é a densidade óptica dos complexos avaliados e CC, CF e CM são as densidades ópticas dos controles citados no texto acima. Os valores de CI_{50} foram calculados por meio da curva de % de inibição *versus* concentração obtida no programa OriginPro8 e ajustada por *FitSigmoidal (Boltzmann)*.

$$\% \text{ Inibição} = 100 - [(EC - CC) \times 100 / (CF - CM)]$$

Equação 2.3

2.3.4 Estudos de interação com albumina sérica humana (ASH)

Os estudos de interação dos complexos de rênio(I) e cobalto(III) com ASH foram realizados por meio da espectroscopia de fluorescência.²²⁻²⁴ Esses estudos baseiam-se na capacidade do composto de interesse em suprimir a fluorescência da ASH. Quando excitada a 295 nm, a mesma emite fluorescência devido ao resíduo de triptofano-214 (Trp-214).^{25,26}

A solução estoque de ASH foi preparada em tampão 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH = 7,4. A concentração da solução estoque utilizada nesse experimento foi ajustada para aproximadamente 2 μM por meio da obtenção do seu espectro de absorção usando $\epsilon = 35.353$

²¹ A. S. Zacchino, M. P. Gupta, *Manual de técnicas in vitro para ladetección de compuestos antifúngicos*, in, Rosario: Corpus Editorial y Distribuidora, 2007, pp. 85-99.

²² E. Alarcón, A. Aspée, M. González-Béjar, A. M. Edwards, E. Lissi, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (2010) 861.

²³ F. J. Fard, Z. M. Khoshkhoo, H. Mirtabatabaei, M. R. Housaindokht, R. Jalal, H. E. Hosseini, M. R. Bozorgmehr, A. A. Esmaeili, M. J. Khoshkholgh, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 74.

²⁴ J. G. Da Silva, A. A. R. Despaigne, Sonia, R. W. Louro, C. C. Bandeira, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415.

²⁵ S. Bobone, M. van der Weert, L. Stella, *J. Mol. Struct.* 1077 (2014) 68.

²⁶ E. Alarcón, A. M. Edwards, A. Aspee, F. E. Moran, C. D. Borsarelli, E. A. Lissi, D. Gonzalez-Nilo, H. Poblete, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (2010) 93.

$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ a 280 nm.²² Essa solução foi estocada em geladeira e utilizada em um prazo máximo de uma semana.

As soluções estoque dos complexos ($C = 0,5 \text{ mM}$, DMSO) foram preparadas no momento da realização do experimento. A solução estoque de ASH (3 mL a $2 \mu\text{M}$) foi titulada através de 7 adições de $10 \mu\text{L}$ do composto em estudo. A mistura foi mantida sob agitação e cada adição foi feita num intervalo fixo de tempo, como por exemplo, adições de 5 em 5 min. A quantidade de DMSO dentro da cubeta foi de no máximo 2,5 % v/v, garantindo a não interferência do mesmo nos resultados. O espectro de emissão de ASH na ausência e na presença dos complexos foi registrado na região de 310 a 550 nm com excitação em 295 nm. As janelas de excitação e emissão, número de leituras e a temperatura (298 K) foram mantidas constantes em todos os experimentos.

O mecanismo de supressão pode ocorrer de várias maneiras diferentes, sendo que os principais são: estático ou dinâmico. No mecanismo dinâmico ocorrem colisões (encontros difusivos) entre o agente supressor (composto em estudo) e o fluoróforo (ASH). Por outro lado, no mecanismo estático o agente supressor forma um complexo não fluorescente com o fluoróforo.^{27,28}

Os parâmetros relacionados à diminuição da intensidade de fluorescência do ASH, por mecanismo dinâmico, podem ser calculados usando as equações de Stern-Volmer (Equações 2.4 e 2.5),

$$F_0/F = 1 + K_D [Q] \quad \text{Equação 2.4}$$

$$K_D = K_q \tau_0 \quad \text{Equação 2.5}$$

onde, K_D é a constante de supressão de Stern-Volmer (M^{-1}) que pode ser obtida pela plotagem de F_0/F versus $[Q]$. F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença, respectivamente, do agente supressor da fluorescência, $[Q]$ é a concentração do agente supressor e τ_0 é o tempo de vida da fluorescência na ausência do agente supressor. É interessante notar que, K_D^{-1} é a concentração na qual 50 % da intensidade da fluorescência é suprimida, ou seja, $F_0/F = 2$.

²⁷ C. D. Geddes, *Meas. Sci. Technol.* 12 (2001) R53.

²⁸ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. 3rd ed. Springer, p. 277-330, 2006.

Por meio da Equação 2.4 pode-se obter o valor da constante de supressão dinâmica ou bimolecular, K_q . Este é um dos parâmetros que nos dá informações sobre a eficiência (ou acessibilidade do agente supressor ao fluoróforo) e o mecanismo de supressão. Em processos dinâmicos, o valor máximo encontrado para essa constante foi de aproximadamente $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em solução aquosa. Valores maiores de K_q indicam a formação de ligação entre o agente supressor e o fluoróforo.^{22,27,28} Os mecanismos estático e dinâmico podem ser distinguidos por meio de medidas do tempo de vida de fluorescência, obtenção de espectros de absorção do fluoróforo e por estudos variando a temperatura ou a viscosidade do meio.²⁸

Se o mecanismo de supressão for dinâmico, a constante de Stern-Volmer é chamada de K_D . Para qualquer outro processo, a constante é chamada de K_{SV} . No caso do mecanismo estático, essa constante é denominada K_S e é definida como constante de associação do complexo formado pelo agente supressor e o fluoróforo.^{27,28} Neste caso, a equação de Stern-Volmer (Equação 2.4) pode ser representada pela Equação 2.6. No mecanismo de supressão estática, o tempo de vida da fluorescência na ausência do agente supressor (τ_0) permanece constante ($\tau_0 = 2,7 \text{ ns}$ para Trp-214).²⁸

$$F_0/F = 1 + K_S [Q] \quad \text{Equação 2.6}$$

Outros parâmetros de interesse podem ser obtidos por meio da Equação de Scatchard^{24,29-31} (Equação 2.7),

$$\log[(F_0-F)/F] = \log[K_b] + n \log[Q] \quad \text{Equação 2.7}$$

onde, K_b é a constante de ligação ou constante de associação aparente para a interação proteína-agente supressor e n é o número de sítios de ligação. Os valores de n e K_b podem ser obtidos do coeficiente angular e intercepto, respectivamente, da plotagem linear de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[Q]$.

Além dos mecanismos dinâmico e estático que ocorrem com fluoróforo na presença de um agente supressor, a supressão pode ocorrer por meio da atenuação da luz incidente pelo fluoróforo ou outra espécie absorvedora. A atenuação da luz incidente ocorre devido a absorção ou espalhamento da fluorescência emitida, provocando um aparente decréscimo da

²⁹ N. Wang, L. Ye, B. Q. Zhao, J. X. Yu, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41 (2008) 589.

³⁰ X. Fu, Z. Lin, H. Liu, X. Le, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 122 (2014) 22.

³¹ A. Ray, B. K. Seth, U. Pal, S. Basu, *Spectrochim. Acta Part A* 92 (2012) 164.

intensidade de fluorescência. Este processo é chamado efeito filtro e a intensidade de fluorescência depende das densidades ópticas da amostra nos comprimentos de onda de excitação e emissão.²⁸ O efeito pode ser corrigido usando a Equação 2.8, na qual F_{corr} é a fluorescência corrigida, F_{obs} é a fluorescência observada a 340 nm, DO_{ex} e DO_{em} são as densidades ópticas observadas nos comprimentos de onda de excitação (295 nm) e emissão (340 nm), respectivamente.

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{[(DO_{\text{ex}} + DO_{\text{em}})/2]} \quad \text{Equação 2.8}$$

Sendo assim, as Equações 2.6 e 2.7 serão substituídas pelas Equações 2.9 e 2.10.

$$F_0/F_{\text{corr}} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_S [Q] \quad \text{Equação 2.9}$$

$$\log[(F_0 - F_{\text{corr}})/F_{\text{corr}}] = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação 2.10}$$

2.3.5 Estudos de interação com o agente redutor ditionito de sódio (DTN)

Redução dos complexos (4) e (7) na presença de 10 ou 3 equivalentes molares do redutor ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) foi monitorada em função do tempo por espectroscopia eletrônica. Para tanto, foram preparadas soluções dos complexos (4) e (7) (25 μM) em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM, Tris-HCl 5 mM, pH = 7.2) 5% DMSO.

Soluções do complexo (4) em Tris-HCl 5% DMSO contendo 3 ou 10 equivalentes molares de DTN foram também monitoradas em função do tempo ($t = 10$ min, $t = 1$ h e $t = 2$ h) por espectrometria de massas. Espectros de massas do complexo (4) e do ligante H2AcPh (25 μM) na ausência do agente redutor foram obtidos para comparação de resultados.

Capítulo 3 Complexos de rênio(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Neste capítulo são apresentadas a caracterização e a investigação de bioatividades de três complexos organometálicos de rênio(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina (Figura 3.1). Estes complexos tiveram sua atividade avaliada contra os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Testes de citotoxicidade foram realizados frente às células NCI-H460 (carcinoma pulmonar humano) e frente às células não-tumorais HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana). Além disso, foram realizados estudos de interação dos complexos de rênio(I) com albumina sérica humana (ASH).

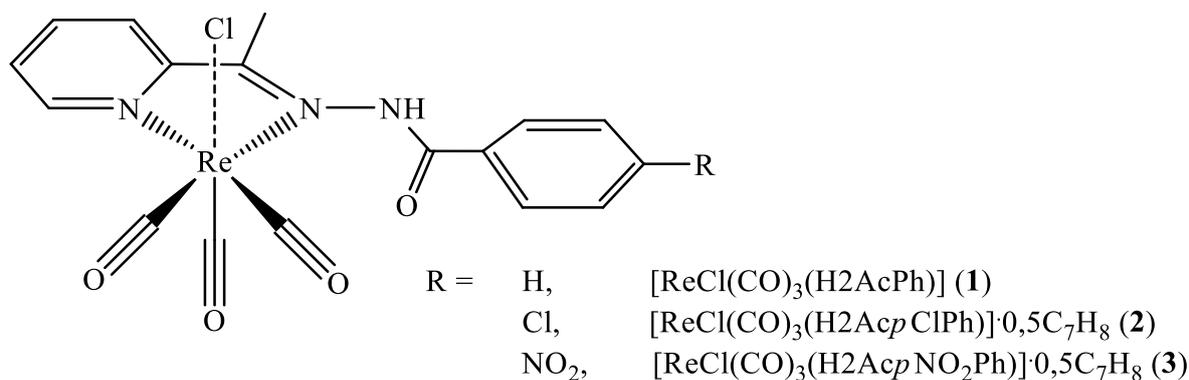


Figura 3.1 Estrutura genérica dos complexos de rênio(I).

3.1 Caracterização dos compostos

Foram obtidos complexos de rênio(I) com 2-acetilpiridina-fenilhidrazona (H₂AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenilhidrazona (H₂Ac_pClPh) e 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenilhidrazona (H₂Ac_pNO₂Ph): [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)] (1), [ReCl(CO)₃(H₂Ac_pClPh)]·0,5C₇H₈ (2) e [ReCl(CO)₃(H₂Ac_pNO₂Ph)]·0,5C₇H₈ (3) (Figura 3.1). As hidrazonas utilizadas na síntese desses complexos já foram descritas na literatura.¹⁻³

¹ J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D. N. Deobagkar, C. E. Anson, A. Powell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 51.

² S. Choudhary, J. R. Morrows, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4096.

³ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. Da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247.

3.1.1 Análises

Rendimento das reações, temperatura de fusão, massas molares, microanálises e condutividade molar dos complexos (**1-3**) estão apresentados na Tabela 3.1. Os resultados das análises estão de acordo com a estrutura proposta para os complexos de rênio(I), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{HL})]$, nos quais uma molécula de hidrazona coordena-se ao íon rênio(I) na forma neutra (HL), juntamente com três ligantes carbonil e um cloreto. As análises condutimétricas indicam que todos os complexos são não-eletrólitos⁴ em DMF (Tabela 2.1, página 24). Os complexos (**2**) e (**3**) contém moléculas de tolueno de cristalização, as quais foram confirmadas por análises termogravimétricas, onde verifica-se a perda de massa equivalente a essas moléculas entre 30 e 150 °C.

Tabela 3.1 Rendimento, temperatura de decomposição^a, análise elementar^b, termogravimetria^b, massa molar e condutividade molar (DMF, 1 mM) dos complexos $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})]$ (**1**), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (**2**) e $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPhNO}_2)] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (**3**)

Compostos	Rend. / %	T _{dec} / °C	% C	% H	% N	TG / %	MM / g mol ⁻¹	Λ _M / cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹
1	89,4	277 (147,4 - 148,2)	37,80 (37,47)	2,43 (2,40)	7,47 (7,71)	---	544,96	7,99
2	89,0	272 (167,0 - 169,0)	37,20 (39,37)	2,34 (2,58)	7,01 (6,72)	7,05 (7,37)	625,48	7,86
3	83,4	274 (220,0 - 224,0)	38,72 (38,71)	2,50 (2,54)	8,99 (8,81)	7,50 (7,26)	636,03	7,87

^a Faixa de temperatura de fusão dos respectivos ligantes entre parênteses;

^b valores teóricos entre parênteses.

3.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os complexos (**1-3**) foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, DEPT 135 e mapas de contorno COSY e HMQC utilizando-se DMSO-d₆ como solvente. Os espectros de RMN dos complexos (**1-3**) foram obtidos no aparelho de 400 MHz. A numeração adotada para a atribuição dos átomos de H e C e os resultados estão apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C{¹H} do complexo (**1**) serão apresentados nas Figuras 3.3 e 3.4.

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

Os espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da hidrazona H2AcPh apresentam sinais duplicados, indicando a existência dos isômeros configuracionais *Z* e *E* (Figura 3.2) em solução, sendo este último o isômero majoritário.³ Conforme apresentado na Tabela 3.2, os sinais de N(3)-H em 10,90 e 15,80 ppm foram atribuídos aos isômeros *E* (97 %) e *Z* (3 %), respectivamente. O sinal mais desblindado (15,80 ppm) é característico de N(3)-H em ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do anel piridínico.⁵ Já no isômero *E*, N(3)-H faz ligação de hidrogênio com o solvente⁶ (DMSO) e o sinal encontra-se mais blindado (10,90 ppm).

No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da hidrazona H2AcPhCl não foram observados sinais referentes ao isômero *Z* devido à baixa solubilidade do composto em DMSO. No entanto, a presença desse isômero pôde ser confirmada pela presença do sinal N(3)-H em 15,86 ppm no espectro de RMN de ^1H . O espectro de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de H2AcPhNO₂ apresenta apenas um sinal para cada hidrogênio e para cada carbono. No espectro de RMN de ^1H o sinal de N(3)-H é observado em 11,21 ppm, indicando a presença do isômero *E*.

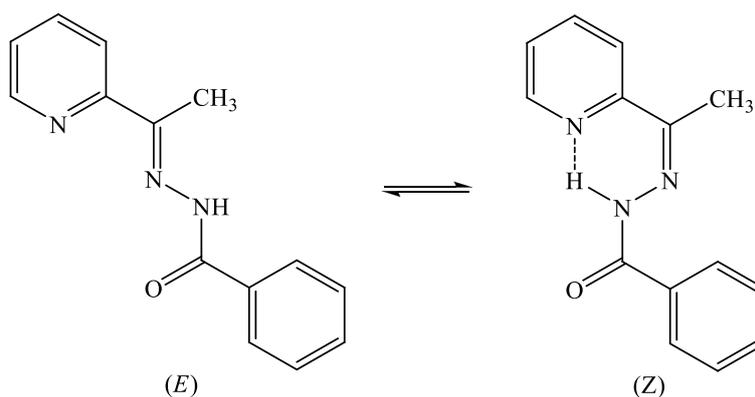


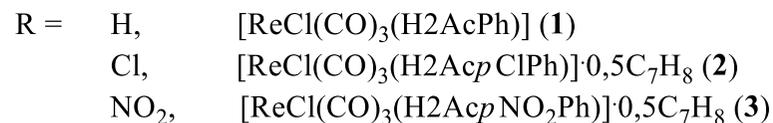
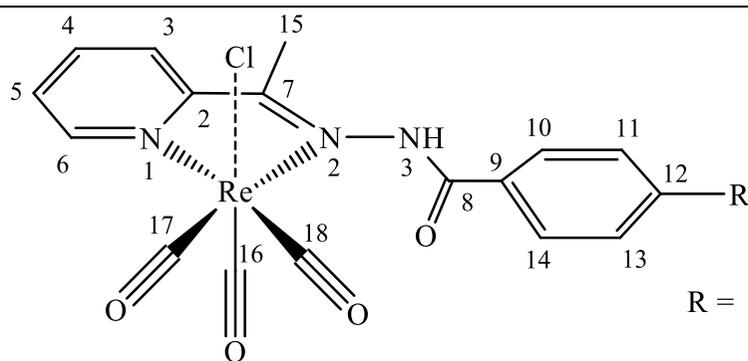
Figura 3.2 Isômeros configuracionais *E* e *Z* da hidrazona H2AcPh.

⁵ A. M. B. Bastos, A. F. C. Alcântara, H. Beraldo, *Tetrahedron* 61 (2005) 7045.

⁶ 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.

Tabela 3.2 Atribuições (A), número de hidrogênio (N°), multiplicidade^a e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹H dos complexos (**1-3**) e hidrazonas livres (DMSO-d₆)

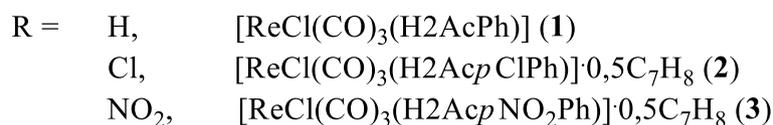
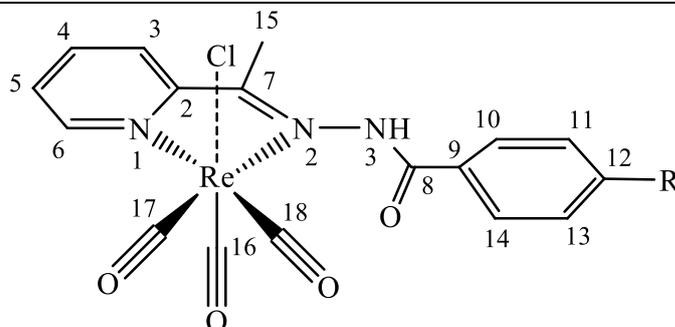
A	N°	δ							
		H2AcPh		1	H2AcpClPh		2	H2AcpNO ₂ Ph ³	3
		Z (3 %)	E (97 %)		Z (2 %)	E (98 %)		E	
N(3)-H	1	15,80 (s)	10,90 (s)	12,50 (s)	15,86 (s)	10,96 (s)	12,60 (s)	11,21 (s)	12,94 (s)
H3	1	7,86 (d)	8,14 (m)	8,46 (d)	---	8,10 (m)	8,47 (d)	8,16 (d)	8,49 (d)
H4	1	8,12 (m)	7,85 (m)	8,37 (td)	---	7,84 (m)	8,37 (td)	7,91 (t)	8,41 – 8,37 (m)
H5	1	7,61 (m)	7,42 (m)	7,85 - 7,88 (m)	---	7,43 (t)	7,85 – 7,88 (m)	7,47 (t)	7,86 – 7,90 (m)
H6	1	8,91 (d)	8,66 (d)	9,06 (d)	8,92 (d)	8,62 (d)	9,06 (d)	8,64 (d)	9,07 (d)
H10 e H14	2	7,93 (m)		8,00 (d)	---	7,92 (m)	8,01 (d)	8,19 (d)	8,22 (d)
H11 e H13	2	7,54 (d)		7,57 (t)	---	7,60 (d)	7,66 (d)	8,38 (d)	8,42 (d)
H12	1	7,61 (m)		7,64 (t)	---	---	---	---	---
H15	3	2,49 (s)	2,46 (s)	2,62 (s)	---	2,50 (s)	2,62 (s)	2,50 (s)	2,67 (s)



^a Multiplicidade: s = simpleto; d = duplo; t = triplo; m = multiplo; td = triploduplo.

Tabela 3.3 Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 dos complexos (1-3) e hidrazonas livres (DMSO- d_6)

A	DEPT ^a	δ						
		H2AcPh		1	H2Ac p ClPh	2	H2Ac p NO $_2$ Ph ³	3
		Z	E		E		E	
C2	---	144,6	143,4	153,3	144,4	153,2	149,1	153,1
C3	↑	124,8	120,3	128,9	120,4	129,0	120,4	129,2
C4	↑	138,6	136,5	140,2	136,4	140,2	136,6	140,3
C5	↑	124,7	124,0	129,5	124,2	129,6	124,3	129,8
C6	↑	147,7	148,5	153,2	148,6	153,2	148,6	153,3
C(7)=N	---	152,4	155,0	177,5	155,0	177,8	154,8	178,2
C(8)=O	---	164,0	162,5	162,5	163,2	161,5	162,7	161,0
C9	---	131,9	131,5	132,2	132,7	130,9	134,1	137,8
C10 e C14	↑	128,2		128,0	130,2	130,2	129,5	129,5
C11 e C13	↑	128,2		128,5	128,3	128,3	123,3	123,8
C12	↑ / --- / ---	133,3	133,9	132,2	136,6	137,1	139,6	149,6
C15	↑	12,4	22,1	16,5	12,5	16,5	12,8	16,6
C16	---	---	---	198,2	---	198,2	---	198,2
C17	---	---	---	197,0	---	197,0	---	197,1
C18	---	---	---	188,0	---	188,0	---	188,0



^a ↑ representa o símbolo convenção no DEPT 135 para CH e CH₃.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e ^1H dos complexos (**1-3**) foi observado apenas um sinal para cada carbono e para cada hidrogênio, característico da configuração *E*. A configuração *E* das hidrazonas coordenadas foi confirmada pela obtenção das estruturas de raios X dos complexos (**1**), (**2a**) e (**3a**), que serão apresentadas posteriormente. Nos espectros de RMN de ^1H de todos os complexos foi possível observar mudanças nos deslocamentos dos hidrogênios associados com a ligação ao metal. Os principais sinais afetados pela complexação são referentes aos hidrogênios piridínicos e dos grupos N(3)-H e acetyl. Não foram observadas mudanças significativas nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do grupo fenil.

O espectro de RMN de ^1H do complexo (**1**) está apresentado na Figura 3.3. No espectro do complexo observa-se um duplete em 9,06 ppm, referente ao hidrogênio H6, o qual se encontra deslocado em relação à hidrazona livre (8,63 ppm). Os sinais dos demais hidrogênios da piridina também se deslocaram e foram observados em torno de 7,85 – 8,46 ppm, indicando a coordenação do metal *via* átomo de nitrogênio heteroaromático. O sinal de hidrogênio do grupo C(15)-H aparece deslocado (2,62 ppm) em relação à hidrazona livre (2,50 ppm), indicando a coordenação *via* nitrogênio imínico. O sinal de hidrogênio do grupo N(3)-H foi observado em 12,50 ppm.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ também foi possível observar um deslocamento significativo dos sinais das hidrazonas após a coordenação ao rênio(I), principalmente os sinais dos carbonos C2, C7 e C15 (Tabela 3.3). Na Figura 3.4 estão apresentados como exemplo os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante H2AcPh e do complexo (**1**).

Além disso, no espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo (**1**) foi possível observar três sinais de carbono em 198,2, 197,0 e 188,0 ppm referentes ao grupo *fac*-[Re(CO)₃]⁺ em que os três ligantes faciais C≡O estão em posição *trans* aos grupos N_{py}, N_{imina} e Cl. Os dois sinais mais desblindados (198,5 e 197,5 ppm) são referentes ao ligante C≡O em posição basal (C17 e C18) enquanto que o sinal em 188,0 ppm refere-se ao grupo C≡O em posição axial (C16). Essa diferença de deslocamento químico entre as posições axial e basal está relacionada com as diferentes característicasceptoras/doadoras dos átomos de nitrogênio da hidrazona e do ligante cloreto situados em posição *trans* ao grupo carbonil.

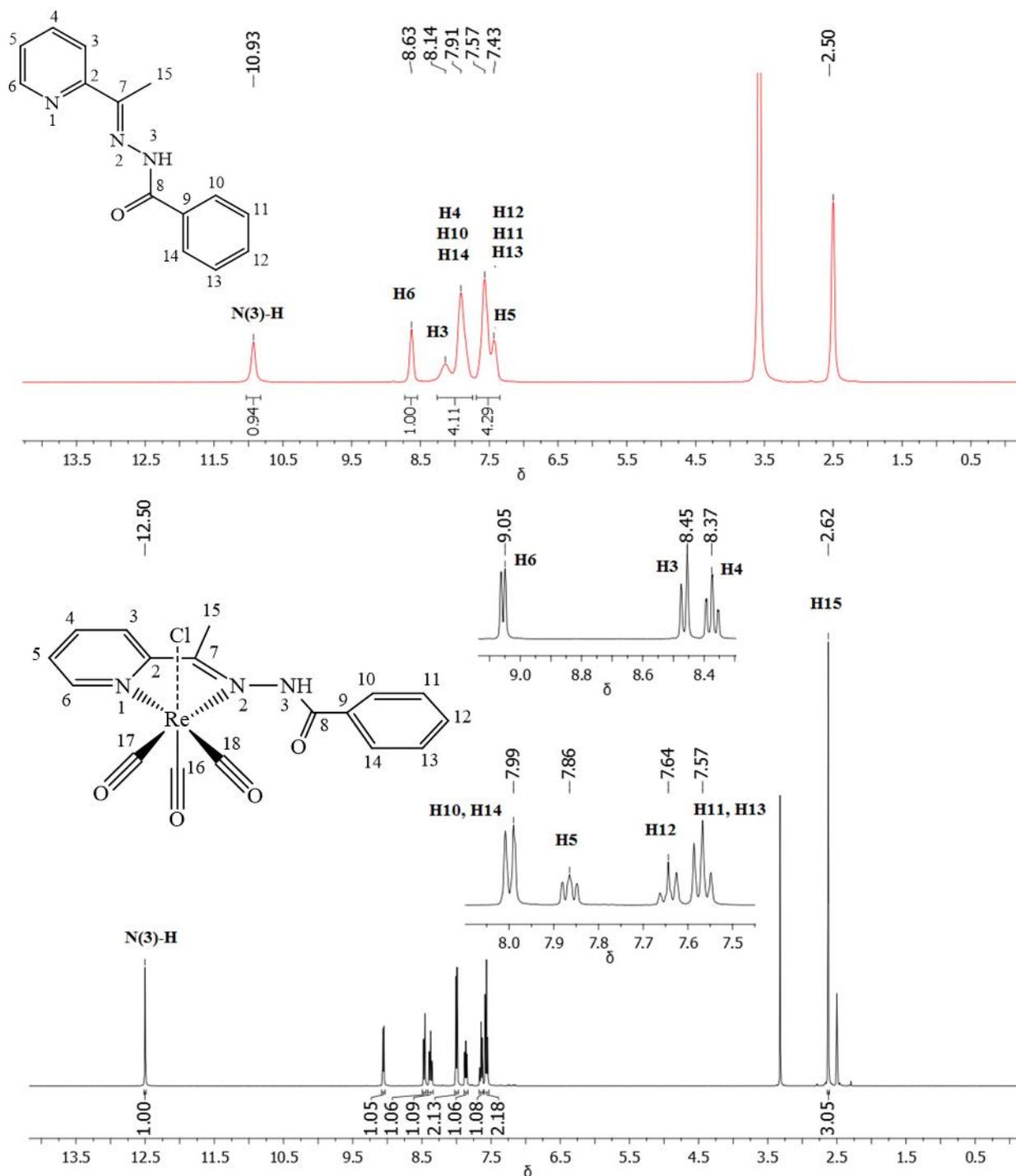


Figura 3.3 Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆) do ligante H₂AcPh (200 MHz) e seu complexo [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)] (1) (400 MHz).

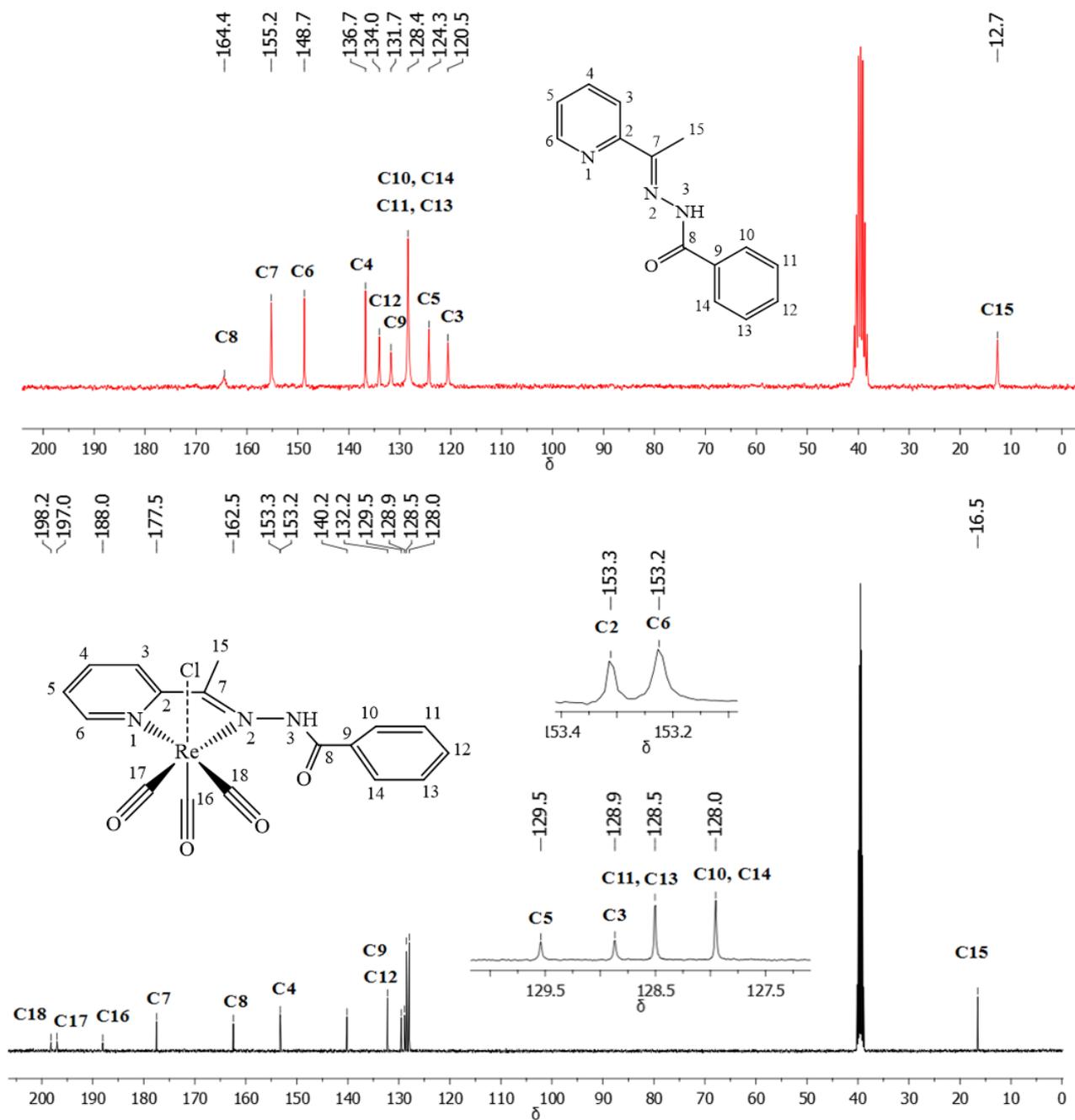


Figura 3.4 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO-d_6) do ligante H_2AcPh (200 MHz) e seu complexo $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcPh})]$ (1) (400 MHz).

Ligantes do tipo π -doadores (representados pela Figura 3.5 A) são aqueles que possuem orbitais de simetria π em torno do eixo da ligação M-L já preenchidos por elétrons, como por exemplo Cl^- , OH^- e H_2O . Já os ligantes π -aceptores (representados pela Figura 3.5 B) são aqueles que possuem orbitais π^* (π anti-ligantes) vazios e podem receber densidade eletrônica proveniente dos orbitais d do metal. Neste caso, o ligante doa densidade eletrônica via ligação

σ e recebe via ligação π . Este processo é chamado de retrodoação. Compostos tais como CO, N₂ e PR₃ são exemplos típicos de ligantes π -aceptores.⁷

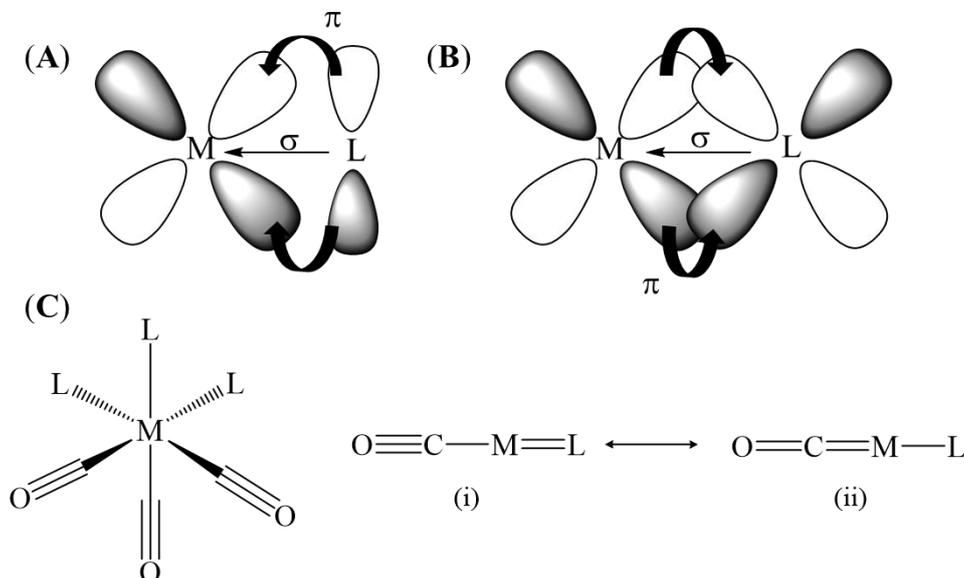


Figura 3.5 Esquema mostrando a doação de elétrons entre os orbitais d vazios do metal e um ligante do tipo π -doador (A) e π -aceptor (B). Arranjo espacial de ligantes carbonil e ligantes L, com diferentes características aceptoras/doadoras, em torno do centro metálico (C). (i) e (ii) são as formas canônicas em torno do centro metálico.

Na Figura 3.5 C está representado um complexo octaédrico com ligantes carbonil e ligantes L com diferentes características π -aceptoras. Quando L = CO, a retrodoação irá ocorrer em ambos os sentidos ao longo de um eixo OC-M-CO, pois têm-se os mesmos ligantes com as mesmas características π -aceptoras. Neste caso, ambas as formas canônicas (i) e (ii) irão contribuir para o híbrido de ressonância (50 % de retrodoação para cada ligante). Quando outros ligantes π -aceptores presentes no complexo competem pelos elétrons d do metal, a forma canônica (i) irá prevalecer. Este comportamento é contrário ao observado com ligantes π -doadores, que irão fornecer elétrons ao átomo metálico e, indiretamente, para os orbitais π^* do CO, fazendo com que a forma canônica (ii) prevaleça.⁷

No caso dos complexos (1-3), o átomo de carbono C16, que é *trans* ao ligante π -doador cloreto, participa de uma ligação C(16)O com mais caráter de ligação dupla [forma canônica (ii)] do que os átomos de carbono (C17 e C18) que estão em posição *trans* aos átomos de nitrogênio N1 e N2, justificando a atribuição do sinal do carbono C16 em 188,0 ppm.

⁷ P. Atkins, T. Overton, J. Rourke, M. Weller, F. Armstrong, M. Hagerman, *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, W. H. Freeman and Company, Fifth Edition, 824p, 2010.

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, bem como a presença do sinal de hidrogênio do grupo N(3)-H, corroboram com a proposta da coordenação bidentada das hidrazonas ao rênio(I) *via* átomo de nitrogênio piridínico (N_{py}) e átomo de nitrogênio imínico (N_{imina}).

3.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Na Tabela 3.4 estão apresentados os números de onda máximos das bandas mais importantes observadas nos espectros vibracionais das hidrazonas livres e seus complexos de rênio(I) na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Nos espectros das hidrazonas livres foi possível observar bandas em torno de 3181 – 3288 e 1653 – 1676 cm^{-1} as quais foram atribuídas aos estiramentos dos grupos N-H e C=O, respectivamente.⁸ Nos espectros dos complexos (**1-3**) as bandas de estiramento das ligações N-H e C=O foram observadas em torno de 3214 – 3372 e 1670 – 1682 cm^{-1} , respectivamente. Um espectro de infravermelho representativo dos complexos de rênio(I) com hidrazonas está apresentado na Figura 3.6 .

Nos espectros dos complexos de rênio(I) com hidrazonas são observadas bandas referentes aos estiramentos C=N e C=O, e à deformação no plano do anel piridínico que sofrem deslocamentos significativos quando comparadas aos espectros das hidrazonas livres. Estes deslocamentos são de grande importância na determinação do modo de coordenação do ligante ao centro metálico.

Tabela 3.4 Número de onda / cm^{-1} das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcPh})]$ (**1**), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcpClPh})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (**2**) e $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (**3**), e hidrazonas livres

Compostos	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C}\equiv\text{O})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\rho(\text{py})$
H2AcPh	3181	---	1653	1580, 1544, 1467	621
1	3230	2026, 1912, 1896	1670	1606, 1510, 1478	648
H2AcpClPh	3287	---	1659	1588, 1524, 1474	623
2	3214	2026, 1914, 1900	1678	1596, 1514, 1474	646
H2AcpNO ₂ Ph	3188	---	1676	1580, 1516, 1472	619
3	3372	2022, 1932, 1862	1682	1586, 1530, 1478	644

⁸ K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds* Part B. 6th ed. New York: Wiley, 2009.

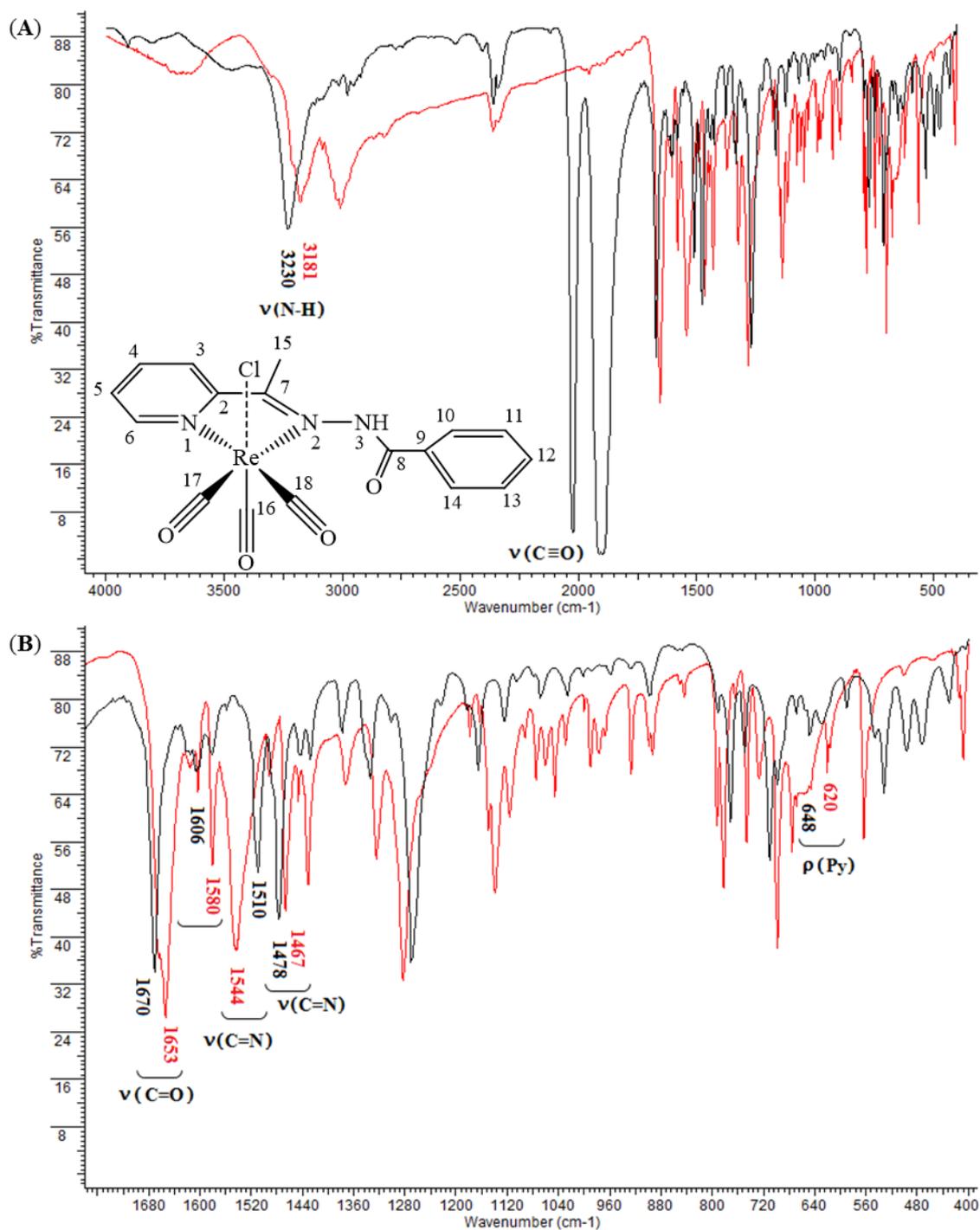


Figura 3.6 Espectros de absorção da região do infravermelho do complexo (1) e da hidrazona H₂AcPh (vermelho), obtidos em pastilha de KBr. Região de 4000 a 400 cm⁻¹ (A) e região expandida (1700 a 400 cm⁻¹) (B).

Como pode ser observado na Tabela 3.4, bandas em torno 1467 – 1588 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento da ligação C=N dos ligantes livres, foram deslocadas para 1474 – 1606 cm⁻¹ após a complexação ao centro metálico, indicando a coordenação do átomo de nitrogênio

imínico.^{3,6,9} A complexação também provoca deslocamento das bandas correspondentes à deformação no plano do anel da piridina para maior número de onda, sugerindo a coordenação *via* átomo de nitrogênio heteroaromático.^{3,6,9}

Nos espectros de todos os complexos foram observadas três novas bandas na região de 1862 - 2028 cm⁻¹, referentes ao estiramento dos grupos C≡O, consistente com a estereoquímica facial (*fac*) em torno do centro metálico.^{10,11} Essas bandas encontram-se deslocadas para menor número de onda em relação ao CO isolado⁷ [$\nu(\text{CO}) = 2143 \text{ cm}^{-1}$] e ao precursor [ReCl(CO)₅], que apresenta três bandas em torno de 1950 – 2050 cm⁻¹.

Como descrito na seção anterior, dependendo do ligante (L) participando da ligação L–M–CO, a ligação CO terá caráter de dupla ou tripla (Figura 3.5 C, pag. 49). As frequências de estiramento CO podem ser utilizadas para determinar a ordem da força doadora ou aceptora de outros ligantes presentes no complexo. A vibração CO aumenta quando L = π -aceptor e diminui quando L = π -doador, como no caso do ligante cloreto. Portanto, a banda em torno de 1862 a 1900 cm⁻¹ no espectro dos complexos (**1-3**) pode ser atribuída ao estiramento da ligação C(16)O.

Os dados de infravermelho reforçam a proposta de formação do complexo [ReCl(CO)₃(HL)] contendo o grupo *fac*-[Re(CO)₃]⁺ e uma hidrazona (HL) se coordenando de forma bidentada pelo sistema N_{py}-N_{imina}.

3.1.4 Cristalografia de raios X

Monocristais dos complexos [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)] (**1**) e [ReCl(CO)₃(H₂AcpNO₂Ph)]·DMSO (**3a**) adequados para a difração de raios X foram obtidos após a recristalização dos compostos a temperatura ambiente em DMSO-d₆. Já os monocristais do complexo [ReCl(CO)₃(H₂AcpClPh)]·DMSO (**2a**) foram obtidos à baixa temperatura (geladeira) em uma mistura DMSO/CH₃OH (1:2).

Medidas de difração de raios X dos cristais dos complexos de rênio(I) foram realizadas em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI (LabCri) com fonte de grafite Mo K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Os dados foram coletados a temperatura ambiente (293 K) ou, no caso do complexo (**2a**), a baixa temperatura (200 K), utilizando o programa CrysAlisPro, versão 1.171.35.21 -

⁹ D. X. West, I. S. Billeh, J. P. Jasinski, J. M. Jasinski, R. J. Butcher, *Transition Met. Chem.* 23 (1998) 209.

¹⁰ N. Lazarova, J. Babich, J. Valliant, P. Schaffer, S. James, J. Zubieta, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 6763.

¹¹ G. Wu, D. R. Glass, d. May, W. H. Watson, D. Wiedenfeld, M. G. Richmond, *J. Organomet. Chem.* 690 (2005) 4993.

Agilent Technologies. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas pelo método de mínimos quadrados F^2 utilizando programas SHELX.¹²

Na Tabela 3.5 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina dos complexos (**1**), (**2a**) e (**3a**), bem como das hidrazonas H2AcPh¹ e H2Ac ρ CIPh¹³ previamente descritas na literatura. Os valores de comprimentos e ângulos de ligação estão apresentados nas Tabelas 3.6 e 3.7.

O complexo (**1**) cristalizou-se no sistema monoclinico (grupo espacial $P2_1/n$) e os complexos (**2a**) e (**3a**) cristalizaram-se no sistema triclínico (grupo espacial P-1), todos contendo apenas uma molécula por unidade assimétrica. As estruturas cristalinas dos complexos (**1**), (**2a**) e (**3a**) estão apresentadas na Figura 3.7. Uma molécula de DMSO está presente nos complexos (**2a**) e (**3a**) como solvente de cristalização. Como mostrado anteriormente pelos espectros de RMN de ¹H, as hidrazonas adotam uma configuração *E* e se coordenam como uma molécula neutra através dos átomos N1 e N2, formando um anel quelato de cinco membros. Embora a literatura relate que as hidrazonas estudadas coordenam a diferentes metais de maneira tridentada (N_{py}-N-O),^{3,13,14} o arranjo facial do grupo [Re(CO)₃]⁺ previne a coordenação tridentada, como observado nas estruturas cristalográficas de outros complexos de tricarbonilrênio(I) com hidrazonas similares.^{15,16}

Comparando-se as distâncias de ligação obtidas para o complexo (**1**) com a hidrazona H2AcPh, podemos verificar o alongamento das ligações C(7)-N(2), N(3)-N(2) e N(1)-C(2), as quais passam de 1,264(3), 1,375(2) e 1,325(3) Å (H2AcPh) para 1,285(4), 1,409(3) e 1,368(4) Å [complexo (**1**)], respectivamente. Foi observado também um pequeno encurtamento do comprimento da ligação C(2)-C(7) do ligante livre [1,487(2) Å] para o complexo (**1**) [1,478(4) Å]. O encurtamento da ligação C(2)-C(7) foi mais pronunciado no caso do complexo (**2a**), variando de 1,4900(18) Å (H2Ac ρ CIPh) para 1,475(4) Å após a complexação.

O cátion rênio(I) liga-se a dois átomos de nitrogênio da hidrazona, um íon cloreto e três ligantes carbonil em um arranjo facial, adotando uma geometria octaédrica distorcida. O arranjo facial do grupo [Re(CO)₃]⁺ é confirmado pelos valores da ligação Re-C e do ângulo C-Re-C em torno de 1,898(5) – 1,915(2) Å e 88,34(11) – 90,27(13)° respectivamente,¹⁷ como mostrado

¹² G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* C71 (2015) 3.

¹³ E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, I. P. Ferreira, J. A. Takahashi, H. Beraldo, *Polyhedron* 97 (2015) 30.

¹⁴ A. A. R. Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron* 38 (2012) 285.

¹⁵ J. Grewe, A. Hagenbach, B. Stromburg, R. Alberto, E. Vazquez-Lopez, U. Abram, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 629 (2003) 303.

¹⁶ P. Barbazan, R. Carballo, I. Prieto, M. Turnes, E. M. Vázquez-López, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 3102.

¹⁷ M. Lipowska, R. Cini, G. Tamasi, X. Xu, A. T. Taylor, L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 7774.

nas Tabelas 3.6 e 3.7. Nessa estrutura, dois grupos carbonil estão ligados em posição basal, *trans* aos átomos N1 e N2, enquanto que o outro grupo carbonil liga-se, juntamente com o íon cloreto, em posição axial. Apesar do maior poder π -receptor dos átomos de nitrogênio da hidrazona quando comparado ao íon cloreto, as distâncias Re-C em posição axial e basal são aproximadamente iguais.

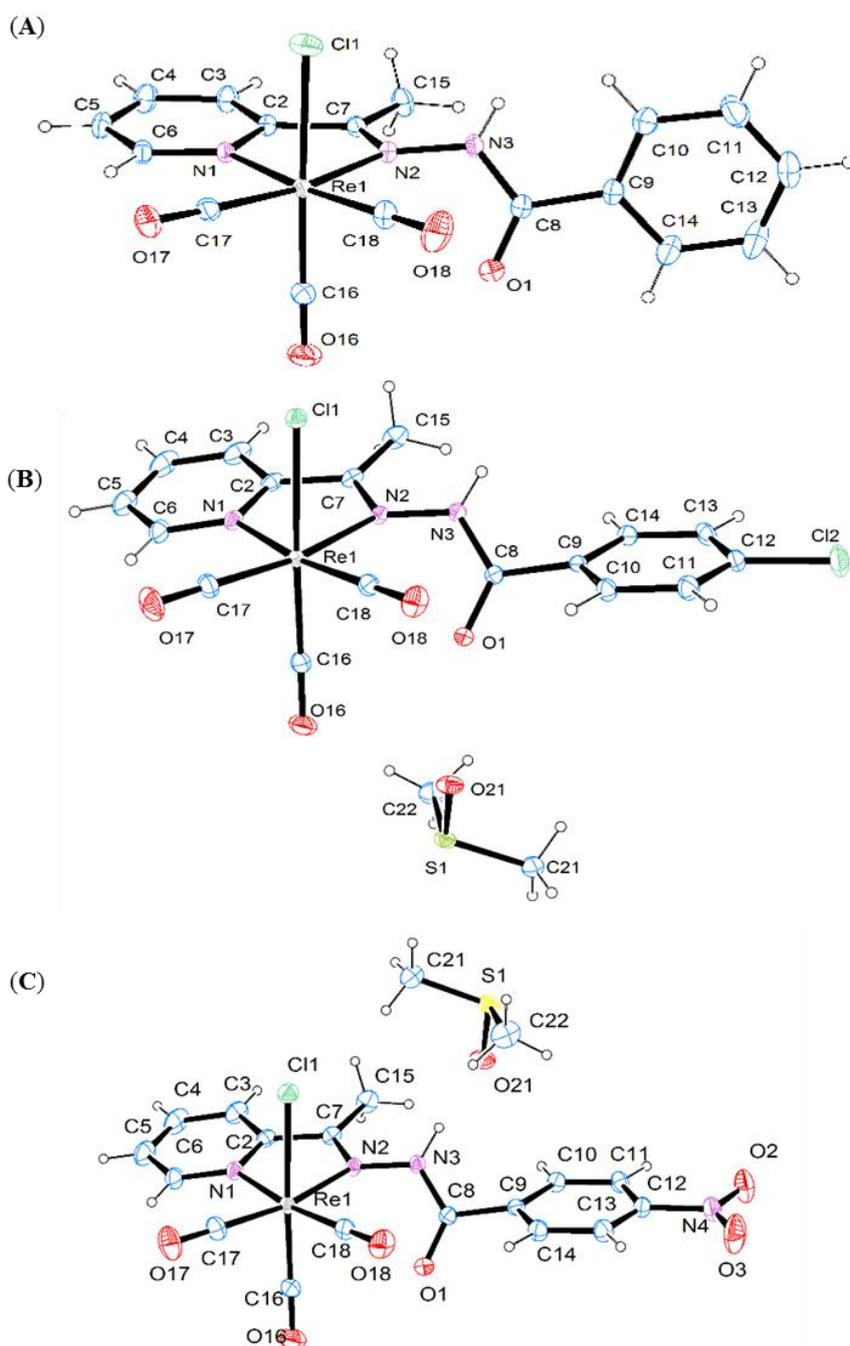


Figura 3.7 Diagramas ORTEP de: $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcPh})]$ (1) (A), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcPhClPh})] \cdot \text{DMSO}$ (2a) (B) e $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{AcPhNO}_2\text{Ph})] \cdot \text{DMSO}$ (3a) (C).

Tabela 3.5 Resumo da coleção de dados cristalográficos e resultados dos refinamentos das estruturas cristalográficas das hidrazonas H2AcPh¹ e H2AcPClPh¹³ e dos complexos [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H2AcPClPh)]·DMSO (**2a**) e [ReCl(CO)₃(H2AcPClNO₂Ph)]·DMSO (**3a**)

Compostos	H2AcPh ¹	1	H2AcPClPh ¹³	2a	3a
Fórmula empírica	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₃ O ₄ Re	C ₁₄ H ₁₂ ClN ₃ O	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₃ O ₅ ReS	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₄ O ₇ ReS
Massa molecular (g mol ⁻¹)	239,27	544,95	273,72	657,52	668,08
Temperatura (K)	200	293(2)	---	200(2)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073	---	0,71073	0,71073
Sistema cristalino, grupo espacial	ortorrômbico, Pbcn	monoclínico, P2 ₁ /n	Monoclínico, P2 ₁ /c	triclínico, P-1	triclínico, P-1
Tamanho do cristal (mm ³)	0,40 x 0,25 x 0,15	0,10 x 0,05 x 0,02	0,65 x 0,23 x 0,14	0,15 x 0,07 x 0,02	0,10 x 0,05 x 0,02
Parâmetros da célula unitária					
a (Å)	18,888(3)	12,6872(2)	5,03660(10)	8,7687(4)	8,8972(5)
b (Å)	7,9514(7)	9,5720(2)	30,8895(7)	11,1002(5)	11,1200(6)
c (Å)	16,0749(15)	14,9830(2)	8,1486(2)	12,9282(5)	12,9995(6)
α (°)	90	90	90	113,002(4)	112,409(4)
β (°)	90	98,300(2)	93,506(2)	97,163(4)	96,989(4)
γ (°)	90	90	90	93,603(4)	93,490(4)
V (Å ³) / Z	2414,3(5) / 8	1800,51(5) / 4	1265,37(5) / 4	1140,66(9) / 2	1172,08(11) / 2
Densidade calculada (mg m ⁻³)	1,317	2,010	1,437	1,914	1,893
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,086	6,925	0,296	5,688	5,434
F(000)	1008	1040	568	636	648
Intervalo de θ (°)	---	1,97 – 33,01	2,59 – 26,37	2,01 – 32,89	2,00 – 29,55
Faixa de índices de Miller	---	-19 ≤ h ≤ 19	-6 ≤ h ≤ 6	-13 ≤ h ≤ 13	-11 ≤ h ≤ 10
	---	-14 ≤ k ≤ 13	-38 ≤ k ≤ 38	-16 ≤ k ≤ 16	-11 ≤ k ≤ 15
	---	-22 ≤ l ≤ 22	-10 ≤ l ≤ 10	-19 ≤ l ≤ 19	-17 ≤ l ≤ 17
Reflexões coletadas	4041	39210	25665	35574	8702
Reflexões únicas (R _{int})	1877 (0,0430)	6375 (0,0358)	2592 (0,0324)	7953 (0,0490)	5446 (0,0405)
Completeza	---	θ = 25,24°	θ = 26,34°	θ = 25,24°	θ = 26,32°
Dados/restrições/parâmetros	---	6375 / 0 / 235	2592 / 0 / 176	7953 / 0 / 283	5446 / 0 / 300
S	---	1,189	1,098	1,061	1,089
Índices de R final [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0370	R ₁ = 0,0226; wR ₂ = 0,0615	R ₁ = 0,0328; wR ₂ = 0,0839	R ₁ = 0,0255; wR ₂ = 0,0478	R ₁ = 0,0300; wR ₂ = 0,0676
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,0370; wR ₂ = 0,0973	R ₁ = 0,0343; wR ₂ = 0,0662	R ₁ = 0,0359; wR ₂ = 0,0860	R ₁ = 0,0333; wR ₂ = 0,0508	R ₁ = 0,0395; wR ₂ = 0,0720
Δρ _{máx} e Δρ _{mín} (e Å ⁻³)	0,143 e -0,113	0,923 e -0,854	0,206 e -0,233	0,635 e -1,558	0,662 e -0,884

Tabela 3.6 Principais comprimentos (Å) de ligação das hidrazonas H2AcPh¹ e H2Ac_pClPh¹³ e dos complexos [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H2Ac_pClPh)]·DMSO (**2a**) e [ReCl(CO)₃(H2Ac_pNO₂Ph)]·DMSO (**3a**). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	H2AcPh ¹	1	H2Ac _p ClPh ¹³	2a	3a
N(1)-C(2)	1,325(3)	1,368(4)	1,3345(19)	1,341(3)	1,358(6)
N(3)-C(8)	1,347(3)	1,350(4)	1,3590(17)	1,356(3)	1,354(6)
N(3)-N(2)	1,375(2)	1,409(3)	1,3810(15)	1,395(2)	1,403(4)
C(7)-N(2)	1,264(3)	1,285(4)	1,2860(18)	1,290(3)	1,295(5)
C(7)-C(2)	1,487(2)	1,478(4)	1,4900(18)	1,475(3)	1,479(6)
C(8)-O(1)	1,219(2)	1,223(4)	1,2260(16)	1,217(3)	1,220(5)
C(8)-C(9)	---	1,493(4)	---	1,500(3)	1,506(6)
Re(1)-C(16)	---	1,911(3)	---	1,905(3)	1,898(5)
Re(1)-C(17)	---	1,909(3)	---	1,904(2)	1,900(5)
Re(1)-C(18)	---	1,912(3)	---	1,915(2)	1,913(4)
Re(1)-N(1)	---	2,163(2)	---	2,156(2)	2,157(3)
Re(1)-N(2)	---	2,187(2)	---	2,2069(18)	2,201(3)
Re(1)-Cl(1)	---	2,4872(8)	---	2,4851(6)	2,4877(12)

Observa-se um grande desvio do valor esperado para os ângulos *trans* (180°) em torno do sítio rênio(I) indicando o desvio de uma geometria octaédrica ideal. Para o complexo (**3a**) por exemplo, Re(1)-N(2)-C(17) e Re(1)-N(1)-C(18) são observados em torno de 169,06(17) e 172,55(16)°, respectivamente. Já para ângulo em posição axial, Re(1)-Cl(1)-C(16) [177,53(14)°], ocorre um desvio consideravelmente menor. O mesmo comportamento é observado para os demais complexos. Essa distorção do ângulo em relação a uma geometria octaédrica ideal deve-se, provavelmente, ao requerimento espacial exigido pela coordenação bidentada da hidrazona. Nota-se que o ângulo das ligações N(2)-C(7)-C(2) e N(1)-C(2)-C(7) não sofrem uma variação significativa após a complexação ao metal.

As distâncias Re-N e Re-Cl estão consistentes com valores encontrados na literatura para complexos de rênio(I) similares.¹⁸ Considerando as distâncias das ligação Re-N, foi observado que d(Re-N_{py}), 2,163(2) Å, é consideravelmente próxima de d(Re-N_{imina}), 2,187(2) Å. Essa característica da ligação Re-N já tinha sido previamente observada para [ReBr(CO)₃(Hapbhyd)] (Hapbhyd = 2-acetilpiridina-fenilhidrazona).¹⁸ Por outro lado, nos complexos (**2a**) e (**3a**) observa-se d(Re-N_{py}) em torno de 2,16 Å e d(Re-N_{imina}) um pouco mais longa (em torno

¹⁸ J. Grewe, A. Hagenbach, B. Stromburg, R. Alberto, E. Vazquez-Lopez, U. Abram, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 629 (2003) 303.

de 2,20 Å). A proximidade nos valores da distância da ligação Re-N está coerente pois ambos os átomos de nitrogênio possuem hibridização sp^2 .

Tabela 3.7 Principais ângulos ($^\circ$) de ligação das hidrazonas H2AcPh¹ e H2Ac_pClPh¹³ e dos complexos

[ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H2Ac_pClPh)]·DMSO (**2a**) e

[ReCl(CO)₃(H2Ac_pNO₂Ph)]·DMSO (**3a**). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	H2AcPh ¹	1	H2Ac _p ClPh ¹³	2a	3a
C(8)-N(3)-N(2)	117,02(13)	120,4(2)	117,89(11)	118,87(18)	118,6(4)
C(2)-C(7)-C(15)	118,2(2)	119,7(3)	---	119,8(2)	119,4(4)
N(2)-C(7)-C(2)	114,47(15)	115,0(2)	115,12(12)	114,6(2)	114,5(4)
N(1)-C(2)-C(7)	116,2(1)	115,2(2)	116,40(12)	116,0(2)	115,4(3)
N(2)-C(7)-C(15)	127,12(16)	125,3(3)	---	125,6(2)	126,0(4)
C(7)-N(2)-N(3)	119,02(14)	117,1(2)	116,22(11)	117,40(19)	116,5(3)
O(1)-C(8)-N(3)	123,32(15)	121,9(3)	123,28(13)	123,6(2)	124,2(4)
O(1)-C(8)-C(9)	120,68(18)	122,2(3)	---	121,4(2)	120,4(4)
N(3)-C(8)-C(9)	115,99(13)	115,9(3)	---	115,07(19)	115,5(4)
C(16)-Re(1)-C(18)	---	88,92(14)	---	88,45(11)	88,5(2)
C(16)-Re(1)-C(17)	---	90,27(13)	---	88,34(11)	88,6(2)
C(16)-Re(1)-N(1)	---	93,90(11)	---	95,47(10)	95,75(17)
C(16)-Re(1)-N(2)	---	94,13(11)	---	96,98(9)	97,01(17)
C(16)-Re(1)-Cl(1)	---	176,45(10)	---	177,86(7)	177,53(14)
C(17)-Re(1)-N(1)	---	97,63(11)	---	98,32(10)	96,91(17)
C(17)-Re(1)-N(2)	---	170,22(11)	---	170,27(9)	169,06(17)
C(17)-Re(1)-Cl(1)	---	92,77(9)	---	93,30(8)	93,19(17)
C(18)-Re(1)-C(17)	---	87,93(13)	---	89,00(11)	89,30(19)
C(18)-Re(1)-N(1)	---	173,73(11)	---	171,77(9)	172,55(16)
C(18)-Re(1)-N(2)	---	100,72(11)	---	99,25(8)	100,18(15)
C(18)-Re(1)-Cl(1)	---	92,40(11)	---	90,20(8)	89,85(15)
N(1)-Re(1)-N(2)	---	73,51(9)	---	73,13(7)	73,26(13)
N(1)-Re(1)-Cl(1)	---	84,46(6)	---	85,67(6)	85,70(10)
N(2)-Re(1)-Cl(1)	---	82,39(7)	---	81,61(5)	81,47(10)
C(6)-N(1)-Re(1)	---	125,1(2)	---	123,7(2)	124,6(3)
C(2)-N(1)-Re(1)	---	116,82(18)	---	116,84(15)	117,1(3)
C(7)-N(2)-Re(1)	---	119,40(18)	---	117,54(15)	118,2(3)
N(3)-N(2)-Re(1)	---	122,78(18)	---	123,43(13)	123,9(2)
O(16)-C(16)-Re(1)	---	179,1(3)	---	176,8(3)	176,1(4)
O(17)-C(17)-Re(1)	---	178,7(3)	---	178,6(2)	177,8(4)
O(18)-C(18)-Re(1)	---	179,2(3)	---	179,2(2)	179,1(4)

A estrutura cristalina dos complexos (**1**), (**2a**) e (**3a**) é estabilizada por ligações de hidrogênio envolvendo o átomo de nitrogênio doador N3 (Tabela 3.8). Os complexos (**2a**) e (**3a**), os quais possuem uma molécula de DMSO em suas estruturas cristalinas, apresentam distâncias de ligações de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio N3 e o átomo de oxigênio do DMSO, N(3)-O(DMSO), em 2,750(3) e 2,734(5) Å, respectivamente. Essas ligações de hidrogênio afetam a conformação molecular, causando uma rotação em torno da ligação C(8)-C(9). Os ângulos entre os planos A [através dos átomos C(8), C(9), C(10), C(11), C(12), C(13) e C(14)] e B [através dos átomos N(3), C(9) e O(1)] são similares, apresentando valores de 54,75(9) e 54,78(16)° para os complexos (**2a**) e (**3a**), respectivamente.

Tabela 3.8 Distâncias de ligações de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para os complexos [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H₂Ac_pClPh)]·DMSO (**2a**) e [ReCl(CO)₃(H₂Ac_pNO₂Ph)]·DMSO (**3a**)

Compostos	A-H...B	D-H	H...A	D...A	<(DHA)
1	N(3)-H(3)...Cl(1) ⁱ	0,86	2,48	3,317(3)	166,0
2a	N(3)-H(3)...O(21)	0,86	1,89	2,750(3)	175,5
3a	N(3)-H(3)...O(7)	0,926(4)	1,829(3)	2,734(5)	165,3(2)

Transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes i: -x, -y, 1-z.

Por outro lado, para o complexo (**1**) existe uma ligação de hidrogênio intermolecular entre os átomos N(3) e Cl(1), $d[\text{N}(3)\cdots\text{Cl}(1)] = 3,317(3)$ Å. É importante observar que para o complexo (**1**) o ângulo entre os planos A e B (25,55 °) é completamente diferente em relação a esses mesmos ângulos nos complexos (**2a**) e (**3a**), que possuem uma molécula de DMSO em sua estrutura cristalina. No cristal do complexo (**1**) observa-se que os planos C (através do anel piridínico) e D (através do anel benzênico) são perpendiculares entre si, sendo que o ângulo entre os planos do anel é de 82,05(12)°. Já para os complexos (**2a**) e (**3a**) os planos C e D são paralelos e os valores dos ângulos entre esses planos são de 11,55(15) e 9,95(30)°, para **2a** e **3a** respectivamente.

3.2 Avaliação da atividade biológica das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de rênio(I)

3.2.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos complexos foi avaliada contra bactérias *Gram*-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12220) e

Staphylococcus aureus (ATCC 25923), e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), conforme procedimento descrito na seção 2.3.3.1 (pag. 35). Na Tabela 3.9 estão apresentados os valores de CIM obtidos para os complexos, o precursor $[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$, as hidrazonas livres e os fármacos controle (ciprofloxacina e cloridrato de tetraciclina).

De um modo geral, os complexos de rênio(I) estudados não apresentaram atividade significativa contra os microrganismos testados. A atividade das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina foram testadas previamente frente a bactérias (*E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e fungos (*Candida Albicans*).^{3,19} Os resultados mostraram que as hidrazonas são inativas contra *E. faecalis* e, para os demais microrganismo, foi observado que a presença do substituinte *para*-cloro no grupo fenil pode favorecer a atividade desses ligantes.

Conforme mostrado na Tabela 3.9, as hidrazonas H2AcPh e H2AcpClPh mostraram uma pequena atividade contra a bactéria *S. aureus*, com valores de CIM de 130,6 e 76,13 μM respectivamente. Após a complexação ao centro metálico foi observada uma redução na atividade desses ligantes.

Tabela 3.9 CIM / μM das hidrazonas, seus complexos de rênio(I), $[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$, ciprofloxacina e cloridrato de tetraciclina contra *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Compostos	Gram +		Gram -	
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
H2AcPh	> 783,6	> 2089,7	130,6	> 522,4
$[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})]$ (1)	> 458,6	> 917,5	> 229,4	> 229,4
H2AcpClPh	> 685,0	> 456,7	76,13	> 456,7
$[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcpClPh})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (2)	> 399,7	> 799,4	> 199,9	> 199,9
H2AcpNO2Ph	> 659,6	> 1758,9	> 439,7	> 439,7
$[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcpNO}_2\text{Ph})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (3)	> 393,0	> 786,1	> 196,5	> 196,5
$\text{ReCl}(\text{CO})_5$	> 345,6	> 552,9	> 460,8	---
Ciprofloxacina	2,35	2,35	---	---
Cloridrato de tetraciclina	---	---	0,15	7,04

Foram realizadas também triagens dos complexos de rênio(I) contra fungos *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (isolado clínico 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e

¹⁹A. A. R. Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron* 38 (2012) 285.

Candida tropicalis (ATCC 750), conforme procedimento descrito na seção 2.3.3.2 (pag. 36). Utilizou-se o método de microdiluição em placas de 96 poços e a concentração testada foi de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nenhum dos complexos apresentou porcentagem de inibição maior do que 50% na concentração testada. Por esse motivo, não foi necessária a realização do teste para a determinação dos valores de CI_{50} .

3.2.2 Atividade citotóxica

A atividade antiproliferativa dos complexos (**1-3**) foi avaliada frente às células NCI-H460 (carcinoma pulmonar humano) e frente às células não-tumorais HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana). Juntamente com os complexos foram testados também o precursor $[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$ e as hidrazonas livres. Os valores de CI_{50} obtidos por meio do teste de viabilidade celular *in vitro* estão apresentados na Tabela 3.10. Os experimentos foram realizados pelo grupo do Dr. Adilson Kleber Ferreira (Laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Ciências Biomédicas - USP).

Tabela 3.10 Viabilidade celular *in vitro* (CI_{50} / μM) das hidrazonas, seus complexos de rênio(I) e o precursor $[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$ contra as células NCI-H460 e HUVEC

	CI_{50} / $\mu\text{M} \pm \text{DP}$	
	NCI-H460	HUVEC
H2AcPh	> 200	> 200
$[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})]$ (1)	58,51 \pm 7,18	32,16 \pm 7,03
H2AcpClPh	74,65 \pm 2,91	> 200
$[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcpClPh})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (2)	20,51 \pm 0,38	22,55 \pm 6,00
H2AcpNO ₂ Ph	26,95 \pm 5,19	20,58 \pm 1,57
$[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcpNO}_2\text{Ph})] \cdot 0,5\text{C}_7\text{H}_8$ (3)	16,15 \pm 1,45	22,48 \pm 5,38
$[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$	> 200	> 200

*DP = desvio padrão

Após 24 h de tratamento, os complexos (**1-3**) mostraram-se mais citotóxicos contra células NCI-H460 do que as hidrazonas livres e o precursor $[\text{ReCl}(\text{CO})_5]$ (Tabela 3.10). O complexo (**3**) apresentou maior citotoxicidade ($\text{CI}_{50} = 16,15 \mu\text{M}$) contra NCI-H460 do que **1** ($\text{CI}_{50} = 58,51 \mu\text{M}$) e **2** ($\text{CI}_{50} = 20,51 \mu\text{M}$). No entanto, os complexos (**1-3**) também apresentaram maior citotoxicidade contra a célula sadia HUVEC quando comparados às hidrazonas livres. Sendo assim, a complexação das hidrazonas com tricarbonilrênio(I) resultou em complexos com maior citotoxicidade porém sem especificidade.

Para os complexos (2) e (3), os quais apresentaram uma melhor atividade citotóxica, foram realizados estudos de mecanismo de ação, por meio de ensaios de apoptose e dano mitocondrial das células NCI-H460. Estes estudos foram realizados através da marcação das células por cromógenos fluorescentes. Nos ensaios de apoptose as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP). A anexina V é uma proteína que possui a capacidade de se ligar aos resíduos da fosfatidilserina expostos na superfície da membrana plasmática em situações de morte celular.²⁰ A conjugação do corante FITC (Isotiocianato de fluoresceína) à anexina V permite identificar e quantificar células apoptóticas. O iodeto de propídeo foi utilizado para diferenciar as células apoptóticas e necróticas, uma vez que o mesmo é capaz de corar apenas células com membrana plasmática danificada, ou seja, apenas células nos estágios tardios de apoptose ou necrose celular.^{21,22}

Células apoptóticas marcadas com anexina V-FITC e IP foram analisadas por citometria de fluxo após 3 ou 6 h de tratamento com os complexos (2) e (3) (10 μ M). Nos histogramas da Figura 3.8 A estão apresentadas em quadrantes as distribuições das populações de células vivas (Q4 – células não marcadas por anexina e IP), em necrose (Q2 - marcadas por anexina-V e IP) e em apoptose (Q3 – marcadas intensamente por anexina-V), de acordo com a intensidade de marcação pela anexina-V (eixo x) e IP (eixo y). Ambos os compostos induziram apoptose na célula NCI-H460 depois de 3 ou 6 horas de tratamento (Figuras 3.8 A e B). Após 3 horas de tratamento, o complexo (2) já exibiu seu efeito máximo. Por outro lado, 3 apresentou uma resposta tardia (Figura 3.8 B).

Uma vez que o processo de apoptose pode ser desencadeado por reguladores celulares presentes na mitocôndria²³⁻²⁵ torna-se necessária a investigação da integridade da membrana, por meio da determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A determinação de modificações estruturais da mitocôndria foi realizada por meio da incorporação da sonda tetrametil rodamina metil éster (TMRE), um corante fluorescente que se acumula na mitocôndria de células vivas. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial leva à diminuição do acúmulo do corante dentro da mitocôndria e consequente supressão da fluorescência.²⁶

²⁰ J. F. Tait, D. Gibson, K. Fujikawa, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7944-7949.

²¹ I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, *J. Immunol. Meth.* 184 (1995) 39-51.

²² G. Koopman, C. P. M. Reutelingsperger, G. A. M. Kuijten, R. M. J. Keehnen, S. T. Pals, M. H. J. van Oers, *Blood* 84 (1994) 1415 – 1420.

²³ R. A. Gottlieb, *FEBS Lett.*, 482 (2000) 6–12.

²⁴ P. Parone, M. Priault, D. James, S. F. Nothwehr, J. Martinou, *Essays Biochem.* 39 (2003) 41–51.

²⁵ M. O. Hengartner, *Nature* 407 (2000) 770–776.

²⁶ J. Jandova, J. Janda, J. E. Sligh, *Esp. Cell Res.* 319 (2013) 750-760.

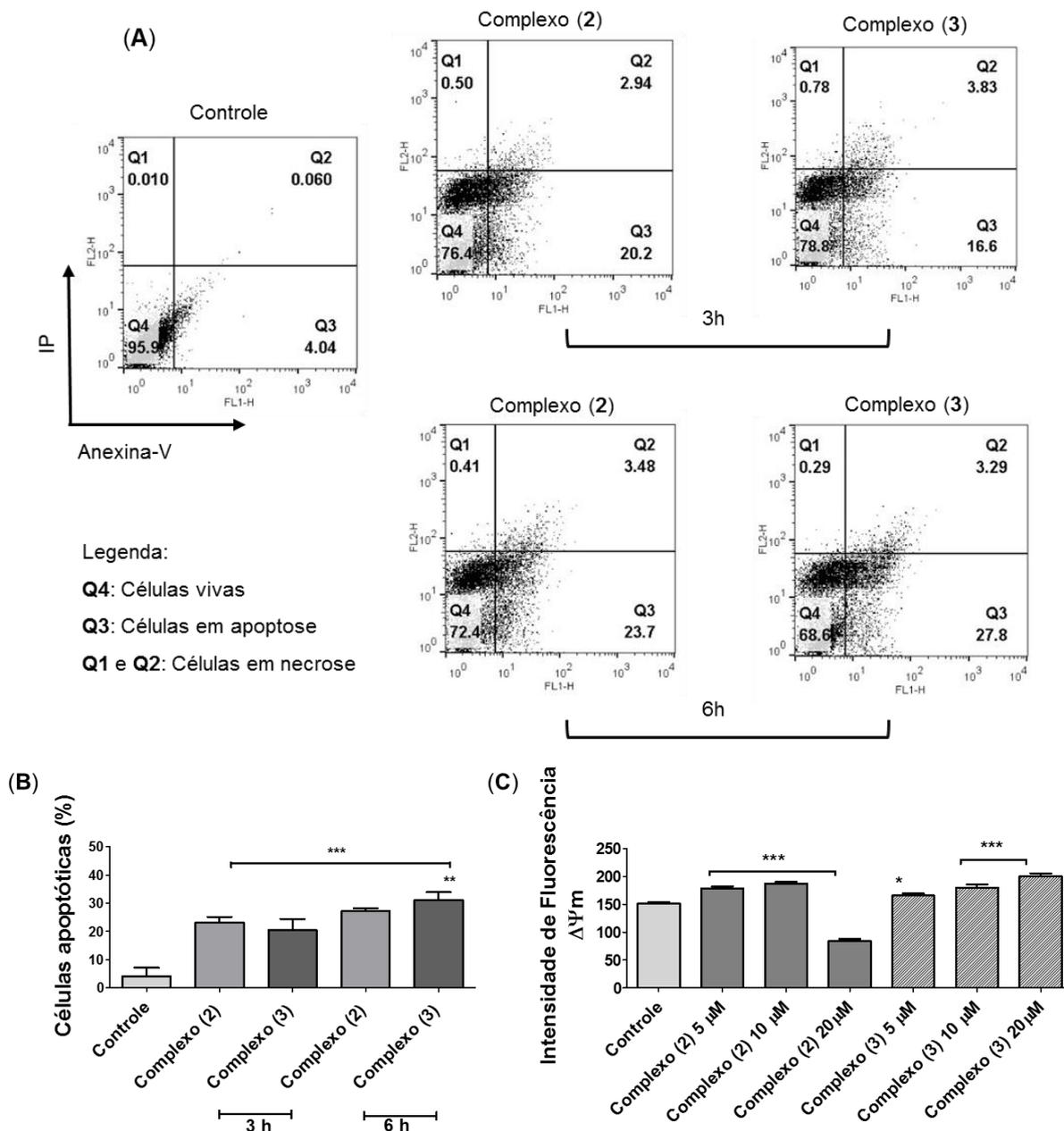


Figura 3.8 Complexos de rênio(I) causam apoptose em células NCI-H460 com subsequente dano mitocondrial. Citometria de fluxo de células NCI-H460 marcadas com anexina V-FITC/IP após 3 ou 6 h de tratamento com os complexos (2) e (3) a 10 μM (A). Quantificação de células apoptóticas tratadas com os complexos (2) ou (3) a 10 μM (B). Modificação do potencial de membrana mitocondrial em resposta aos complexos (2) e (3) a 5, 10 ou 20 μM avaliada pela intensidade de fluorescência de TMRE (C). As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes (p* < 0,05 e p*** < 0,001 versus controle).

Como mostrado na Figura 3.8 C, apenas a mais alta concentração do complexo (2) foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial, indicando que o mesmo foi capaz de modificar a estrutura da membrana. Nas demais concentrações, observou-se um pequeno

aumento no potencial de membrana mitocondrial. Esses dados indicam que o dano mitocondrial causado por **2** é consequência do processo de apoptose. Por outro lado, o tratamento com o complexo **3** mostrou uma resposta tardia, em concordância com o teste de apoptose apresentado anteriormente. O mesmo efeito provavelmente seria observado em concentrações mais altas ou maior tempo de tratamento. Sendo assim, com esses estudos concluímos que os complexos de rênio(I) induzem apoptose com subsequente ruptura mitocondrial.

O estresse oxidativo é uma situação de produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês) decorrente do desequilíbrio dos mecanismos antioxidantes da célula. A geração de ROS em proporções adequadas constitui um processo normal do metabolismo celular. No entanto, sua produção excessiva é prejudicial às células e tecidos, provocando doenças neurodegenerativas, inflamatórias, cardíacas e o câncer.²⁷⁻²⁹ Neste sentido, o desenvolvimento de antioxidantes torna-se essencial.

A produção de ROS, após o tratamento das células NCI-H460 com 10, 20 ou 30 μM dos complexos (**2**) e (**3**), foi analisada por citometria de fluxo utilizando a sonda dihidroetídeo (DHE) que se torna fluorescente após reação com superóxidos. Os resultados estão apresentados na Figura 3.9 como intensidade de fluorescência das células marcadas com DHE. Notavelmente, os complexos (**2**) e (**3**) exibiram alta atividade antioxidante de maneira dose-dependente. Além disso, **2** foi mais potente como antioxidante em células NCI-H460, reduzindo a produção de ROS mesmo a 5 μM . Estes resultados mostram que a produção de ROS induzida pelo complexo (**2**) pode ser relacionada principalmente à propriedade oxidativa do complexo, uma vez que o mesmo não foi capaz de induzir dano mitocondrial nessa concentração.

Embora os complexos (**2**) e (**3**) não tenham mostrado seletividade em relação às células NCI-H460 nas condições estudadas, a viabilidade celular *in vitro* em células HUVEC na presença dos complexos sugeriu a inibição da proliferação de células endoteliais, o que é um mecanismo chave para a angiogênese.^{30,31} Angiogênese é um processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Este processo exerce um papel importante em condições fisiológicas normais tal como no desenvolvimento embrionário e no ciclo menstrual. Por outro lado, este também constitui um processo essencial para o crescimento tumoral e metástase.³⁰

²⁷ L. J. Yan, *Redox Biol.* 2 (2014) 165–169.

²⁸ V. I. Lushchak, *Chem.-Biol. Interact.* 224 (2014) 164–175.

²⁹ P. V. Raninga, G. D. Trapani, K. F. Tonissen, *Oncoscience* 1 (2014) 95–110.

³⁰ P. Nagababu, A. K. Barui, B. Thulasiram, C. S. Devi, S. Satyanarayana, C. R. Patra, B. Sreedhar, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 5226–5241.

³¹ H. Lai, Z. Zhao, L. Li, W. Zheng, T. Chen, *Metallomics* 7 (2015) 439–447.

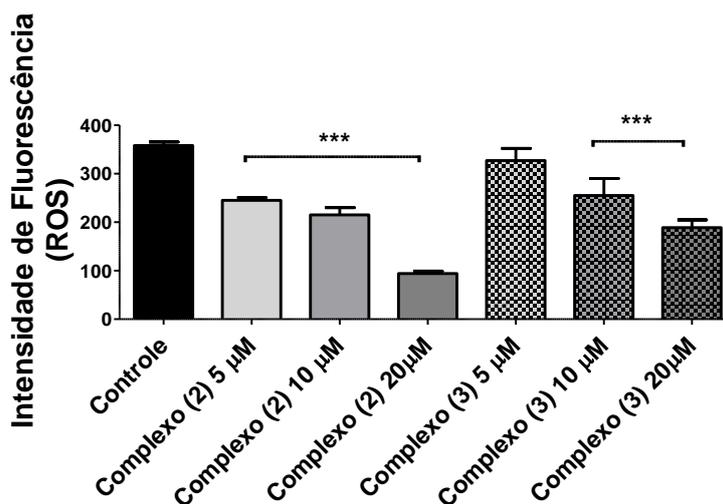


Figura 3.9 Atividade antioxidante dos complexos de rênio(I). As células NCI-H460 foram tratadas com os complexos (2) e (3) a 5, 10 ou 20 μM e marcadas com DHE para avaliar, por citometria de fluxo, mudanças na produção de ROS observadas em células apoptóticas. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes. $p^{***} < 0,001$ versus controle.

3.2.3 Estudos de interação com albumina sérica humana (ASH)

A albumina sérica humana (ASH) é uma proteína abundante do plasma sanguíneo, com importantes funções fisiológicas, destacando-se o transporte de compostos endógenos tais como aminoácidos, gorduras, metais, metabólitos tóxicos, entre outros. Essa proteína também possui capacidade de se ligar a uma variedade de drogas alterando as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das mesmas. Sendo assim, o estudo da interação com ASH tem despertado o interesse dos pesquisadores uma vez que essa interação pode possibilitar o carreamento das drogas para um determinado sítio, diminuindo os efeitos colaterais das mesmas.^{32,33}

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram que complexos de cobre(II) com chalconas derivadas de tiossemicarbazonas interagem com albumina sérica bovina (ASB).³⁴ Outros grupos de pesquisa também mostraram a interação de complexos de cobalto(III),³⁵ cobre(II)^{36,37} e níquel(II)³⁸ com ASH ou ASB.

³² F. Yang, Y. Zhang, H. Liang, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 3581.

³³ U. Kragh-Hansen, V. T. G. Chuang, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695.

³⁴ J. G. Da Silva, A. A. R. Despaigne, Sonia, R. W. Louro, C. C. Bandeira, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415.

³⁵ F. J. Fard, Z. M. Khoshkhoo, H. Mirtabatabaei, M. R. Housaindokht, R. Jalal, H. E. Hosseini, M. R. Bozorgmehr, A. A. Esmaili, M. J. Khoshkholgh, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 74.

³⁶ X. Fu, Z. Lin, H. Liu, X. Le, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 122 (2014) 22.

³⁷ S. Tabassum, W. M. Al-Asbahy, M. Afzal, F. Arjmand, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 114 (2012) 132.

³⁸ A. Ray, B. K. Seth, U. Pal, S. Basu, *Spectrochim. Acta Part A* 92 (2012) 164.

As interações entre os complexos (1-3) e ASH foram estudadas por meio de titulações espectrofluorimétricas. Esses estudos baseiam-se na capacidade dos compostos de interesse em suprimir a fluorescência da proteína que emite fluorescência quando excitada em 295 nm devido ao resíduo de triptofano 214 (Trp-214). Para tanto, a solução estoque de ASH (3 mL a 2 μ M) foi titulada através de 7 adições de 10 μ L dos complexos (1-3) (0,5 mM). A concentração final dos complexos na solução titulada foi em torno de 13 μ M.

Os espectros de fluorescência da ASH na presença de várias concentrações do complexo (1) estão apresentados na Figura 3.10. O primeiro pico com máximo de emissão em torno de 340 nm é referente à ASH na ausência do complexo. Na medida que se aumenta a concentração do complexo (1) observa-se um efeito hipocrômico. A diminuição da intensidade de fluorescência sugere que o complexo é capaz de interagir com ASH suprimindo a fluorescência da mesma. Além disso, foi possível observar um deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção, indicando a diminuição da polaridade e o aumento da hidrofobicidade em torno do resíduo Trp.^{35,39} Esses deslocamentos verticais e horizontais nos máximos de emissão do ASH também foram observados nos espectros obtidos para os complexos (2) e (3).

Como discutido no parágrafo anterior, os complexos (1-3) possuem a capacidade de suprimir a fluorescência da ASH. No entanto, a fim de se obter a extensão real da supressão de fluorescência, foi necessária a correção do efeito filtro uma vez que, na concentração testada, os complexos absorvem nos comprimentos de onda de 295 e 340 nm. Os valores de absorbâncias dos complexos (1-3) durante a titulação, observados nos espectros UV-Vis a 295 e 340 nm, estão apresentados na Tabela 3.11. As concentrações dos complexos na solução titulada estão apresentadas entre parênteses. O efeito filtro deve ser descontado quando o valor de absorbância a 295 e 340 nm for maior que 0,1.⁴⁰ Os complexos (1-3) apresentaram Abs > 0,1 a partir da alíquota 5, justificando a necessidade de descontar o efeito filtro.

³⁹ N. Wang, L. Ye, B. Q. Zhao, J. X. Yu, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41 (2008) 589.

⁴⁰ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. 3rd ed. Springer, p. 277-330, 2006.

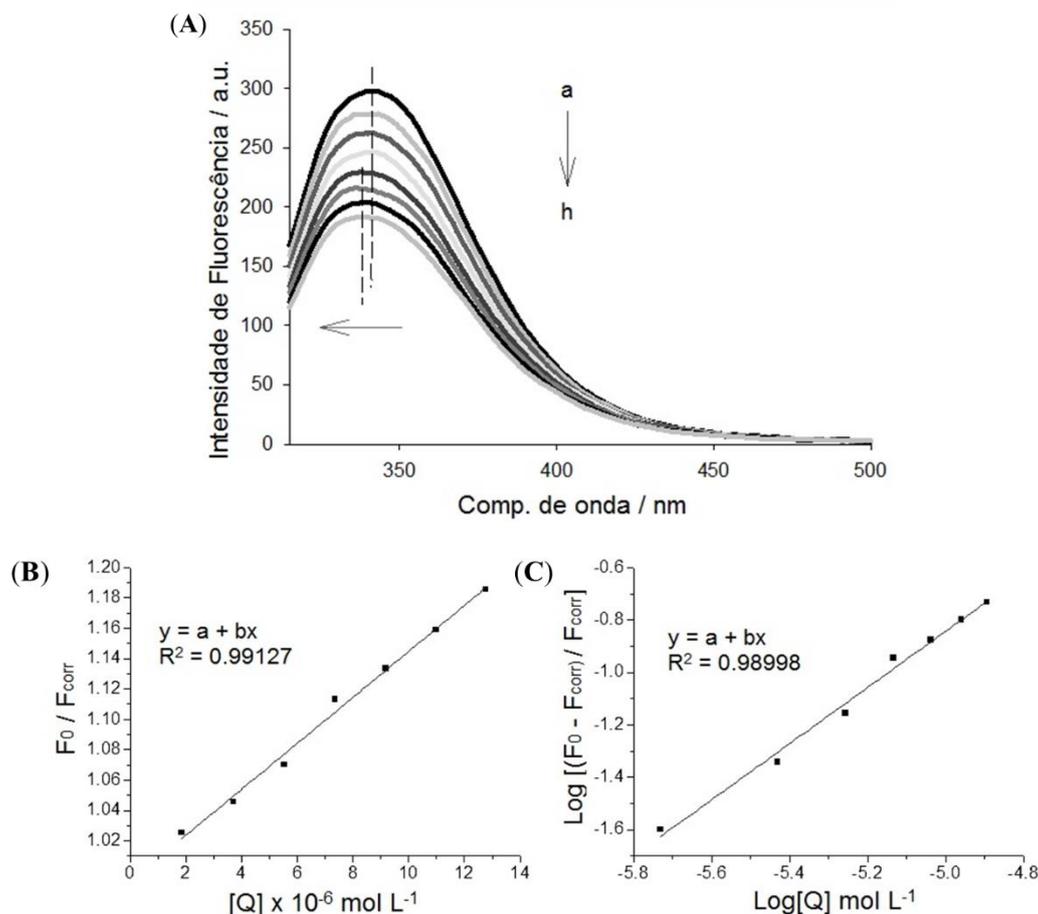


Figura 3.10 Espectros de emissão ($\lambda_{exc.} = 295$ nm) do sistema ASH-1 (tampão 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl; pH = 7,4); (a) 2.0 μ M de ASH; (b-h) 2.0 μ M de ASH na presença de 1,86; 3,71; 5,54; 7,36; 9,17; 11,0 e 12,8 μ M de **1** (A). Condições experimentais: $\lambda_{exc.} = 295$ nm e $T = 25$ °C. Gráficos de F_0/F_{corr} vs $[Q]$ (B) e $\log[(F_0 - F_{corr})/F_{corr}]$ vs $\log[Q]$ (C) para os dados de $\lambda_{em.} = 340$ nm.

Tabela 3.11 Valores de absorvância dos complexos (1-3) na região UV-Vis

Alíquotas	Abs 295 / 340 nm (Concentração / μ M)		
	1	2	3
1	0,022 / 0,015 (1,86)	0,012 / 0,007 (1,62)	0,007 / 0,006 (1,72)
2	0,043 / 0,029 (3,71)	0,030 / 0,020 (3,23)	0,031 / 0,024 (3,44)
3	0,063 / 0,043 (5,54)	0,050 / 0,033 (4,83)	0,063 / 0,049 (5,14)
4	0,082 / 0,054 (7,36)	0,065 / 0,041 (6,42)	0,086 / 0,066 (6,83)
5	0,102 / 0,068 (9,17)	0,082 / 0,054 (7,99)	0,112 / 0,087 (8,51)
6	0,121 / 0,081 (11,0)	0,099 / 0,064 (9,56)	0,141 / 0,109 (11,0)
7	0,140 / 0,094 (12,8)	0,116 / 0,076 (11,1)	0,172 / 0,134 (11,8)

Os parâmetros obtidos a partir dos espectros de emissão do sistema [ASH-complexo de Re(I)] e das Equações 2.9 e 2.10 (pag. 40) estão apresentados na Tabela 3.12. Foram obtidos

valores de K_S em torno de $1,52 - 4,00 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, os quais correspondem à faixa de $0,56 - 1,48 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ obtida para K_q considerando $\tau_0 = 2,7 \text{ ns}$ para Trp-214. Este valor é maior do que o valor de K_q (aproximadamente $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) encontrado em processos dinâmicos, indicando a supressão de fluorescente *via* mecanismo estático, ou seja, formação de ligação entre o agente supressor e o fluoróforo.

Tabela 3.12 Constante de supressão bimolecular (K_q), constante de associação do complexo (K_S), constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) para o sistema [ASH-complexos de Re(I)]

Compostos	$K_S (10^4)$ M^{-1}	$K_q (10^{13})$ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\text{Log } K_b$ $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	n
[ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcPh)] (1)	$1,52 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,02$	$4,51 \pm 0,23$	$1,07 \pm 0,04$
[ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcpClPh)]·0,5C ₇ H ₈ (2)	$4,00 \pm 0,01$	$1,48 \pm 0,04$	$4,32 \pm 0,21$	$0,95 \pm 0,04$
[ReCl(CO) ₃ (H ₂ AcpNO ₂ Ph)]·0,5C ₇ H ₈ (3)	$3,84 \pm 0,08$	$1,42 \pm 0,03$	$3,58 \pm 0,16$	$0,79 \pm 0,03$

Os valores de n são próximos de 1, sugerindo que os complexos de rênio(I) ligam-se ao ASH em uma proporção de 1:1. Os valores do logaritmo da constante de ligação (K_b) obtidos para o sistema [ASH-complexos (**1-3**)] em torno de $3,58 - 4,51 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ são próximos aos valores encontrados por outros compostos de coordenação,^{34,38} sugerindo que os complexos de rênio(I) poderiam ser transportados por ASH.

Capítulo 4 Complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina

Neste capítulo trataremos do estudo complexos de cobalto(III) com 2-acetilpiridina-fenilhidrazona (H2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenilhidrazona (H2AcpClPh) e 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenilhidrazona (H2AcpNO₂Ph), e com 2-acetilpiridina-*N*(4)-feniltiossemicarbazona (H2Ac4Ph), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*p*ClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*ClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*p*NO₂Ph) e 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*NO₂Ph).

Foram obtidos três complexos de cobalto(III) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina (R = H, *p*Cl e *p*NO₂) (Figura 4.1, página 69). Além disso, foram obtidos cinco complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (R = H, *p*Cl, *o*Cl, *p*NO₂ e *o*NO₂) (Figura 4.6, pag. 81).

A atividade antimicrobiana desses complexos foi testada contra bactérias (*E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) e fungos (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Testes de citotoxicidade foram realizados frente células leucêmicas (HL60, Jurkat e THP-1), tumores sólidos (MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116) e células não tumorais (Vero). Estudos eletroquímicos e de interação dos complexos com ditionito de sódio e com albumina sérica humana (ASH) também foram realizados.

4.1 Caracterização dos compostos

A caracterização dos compostos foi dividida em duas partes: na primeira serão abordados os complexos de cobalto(III) com hidrazonas e na segunda, os complexos com tiossemicarbazonas.

4.1.1 Caracterização dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas

Foram obtidos complexos de cobalto(III) com H2AcPh, H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph: [Co(2AcPh)₂]Cl·2H₂O (**4**), [Co(2AcpClPh)₂]Cl·3,5H₂O (**5**) e [Co(2AcpNO₂Ph)₂]Cl·2,5H₂O (**6**) (Figura 4.1). As hidrazonas utilizadas na síntese dos complexos já foram descritas na

literatura.¹⁻⁵ Sendo assim, os espectros das mesmas são utilizados neste capítulo apenas para comparação com os espectros dos seus respectivos complexos.

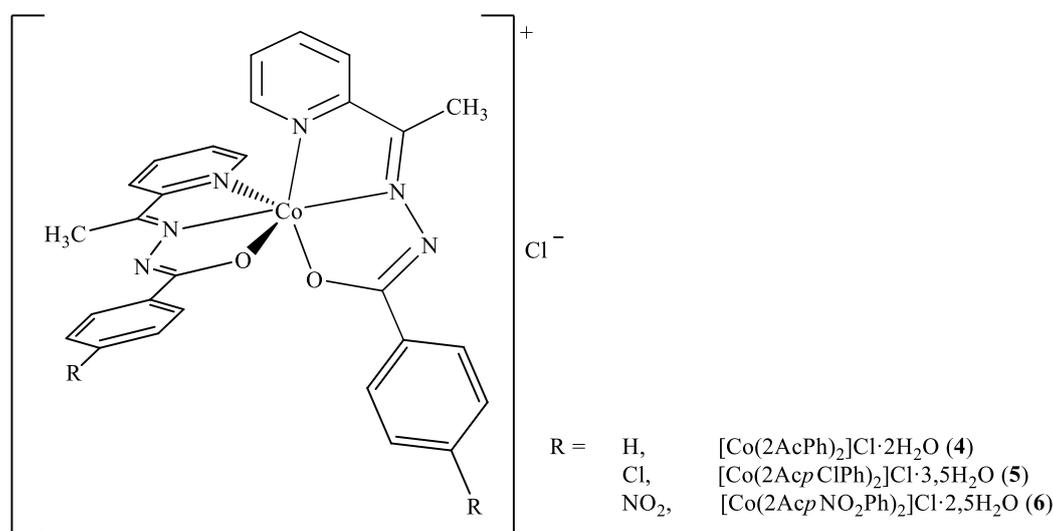


Figura 4.1 Estrutura genérica dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas.

4.1.1.1 Análises

Rendimento das reações, massas molares, microanálises e condutividade molar dos complexos (**4-6**) estão apresentados na Tabela 4.1. Os resultados das análises estão de acordo com a estrutura proposta para os complexos de cobalto(III), $[\text{Co}(\text{L})_2]\text{Cl}\cdot x\text{H}_2\text{O}$, na qual um átomo de cobalto se coordena a duas moléculas de hidrazona na sua forma aniônica (L^-) e um cloreto age como contra-íon. As moléculas de água de hidratação foram confirmadas por espectroscopia de infravermelho e também por análises termogravimétricas, onde verificou-se a perda de massa equivalente a essas moléculas entre 30 e 150 °C.

A presença do íon cloreto como contra-íon foi confirmada pelos valores de condutividade molar em torno de $63,24 - 71,80 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$, indicando que todos os compostos são eletrólitos 1:1 em DMF (Tabela 2.1, pag. 24). A capacidade de os complexos (**4-6**) serem atraídos ou repelidos por um campo magnético, ou seja, a medida de susceptibilidade magnética (χ) foi realizada e valores de χ_g próximos a zero foram encontrados, indicando a presença de um composto diamagnético, íon cobalto(III) (baixo spin, d^6).

¹ J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D. N. Deobagkar, C. E. Anson, A. Powell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 51.

² S. Choudhary, J. R. Morrows, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4096.

³ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. Da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247.

⁴ J. T. Edward, M. Gauthier, F.L. Chubb, P. Ponka, *J. Chem. Eng. Data* 33 (1988) 538.

⁵ M. R. Maurya, S. Agarwal, C. Bader, D. Rehder, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 147.

Tabela 4.1 Rendimento, temperatura de fusão ou decomposição^a, análise elementar^b, termogravimetria^b, massa molar e condutividade molar (DMF, 1 mM) dos complexos [Co(2AcPh)₂]Cl·2H₂O (**4**), [Co(2Ac*p*ClPh)₂]Cl·3,5H₂O (**5**) e [Co(2Ac*p*NO₂Ph)₂]Cl·2,5H₂O (**6**)

Compostos	Rend. /%	T _f ou T _{dec} / °C	% C	% H	% N	TG / %	MM /g mol ⁻¹	Λ _M / cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹
4	32,7	210 - 211 (147,4 - 148,2)	55,63 (55,41)	4,74 (4,65)	14,01 (13,85)	5,66 (5,94)	606,95	71,80
5	43,4	218 - 219 (167,0 - 169,0)	47,95 (47,85)	4,51 (4,16)	12,05 (11,96)	9,44 (8,97)	702,86	65,33
6	24,0	200 (dec.) (220,0 - 224,0)	47,87 (47,64)	3,58 (3,86)	15,77 (15,87)	6,94 (6,38)	705,95	63,24

^a Faixa de temperatura de fusão dos respectivos ligantes entre parênteses (dec = decomposição);

^b valores teóricos entre parênteses.

4.1.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

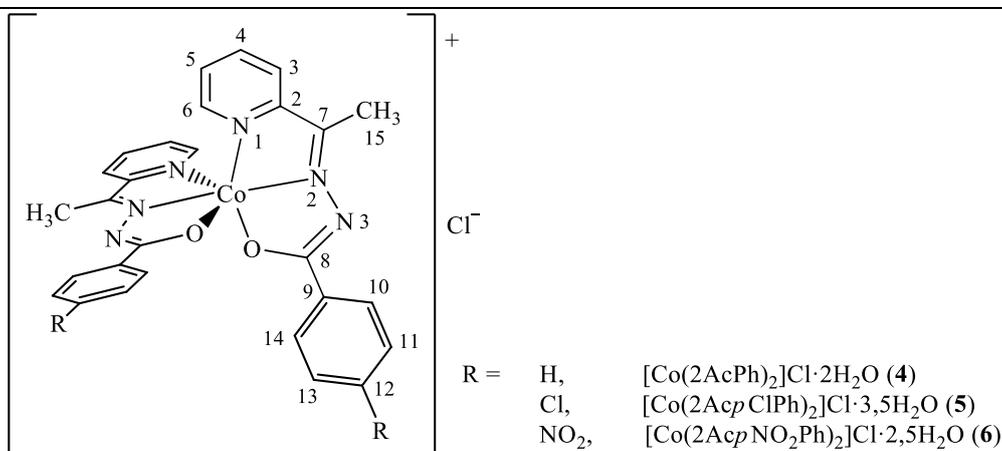
Os complexos (**4-6**) foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, DEPT 135, COSY e HMQC, utilizando-se DMSO-*d*₆ como solvente. Os espectros de RMN dos complexos e das hidrazonas livres foram obtidos no espectrômetro de 200 MHz. A numeração adotada para a atribuição dos átomos de H e C e os resultados obtidos estão apresentadas na Tabela 4.2. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C{¹H} do complexo (**5**) serão apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3.

Nos espectros de RMN de ¹H das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina são observados sinais duplicados devidos à existência dos isômeros configuracionais *Z* e *E* em solução (seção 3.1.2, pag. 43). Os deslocamentos químicos apresentados na Tabela 4.2 para as hidrazonas livres se referem ao isômero majoritário (*E*).

Nos espectros de RMN de ¹H de todos os complexos foi possível observar mudanças nos deslocamentos dos hidrogênios associados com a ligação ao metal. No caso das hidrazonas os principais sinais afetados pela complexação são referentes aos hidrogênios da piridina e dos grupos N(3)-H e acetil.

Tabela 4.2 Atribuições (A), número de hidrogênio (N°), multiplicidade^a, deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹H (acima), atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹³C{¹H} e DEPT^b 135 (abaixo) dos complexos (**4-6**) e hidrazonas livres (DMSO-d₆)

δ							
A	N°	H2AcPh	4	H2AcpClPh	5	H2AcpNO ₂ Ph ³	6
N(3)-H	1	10,90 (s)	---	10,96 (s)	---	11,21 (s)	---
H3	1	8,14 (m)	8,24 – 8,22 (m)	8,10 (m)	8,25 - 8,23 (m)	8,16 (d)	8,33 – 8,16 (m)
H4	1	7,85 (m)	8,24 – 8,22 (m)	7,84 (m)	8,25 - 8,23 (m)	7,91 (t)	8,33 – 8,16 (m)
H5	1	7,42 (m)	7,57 – 7,47 (m)	7,43 (t)	7,55 -7,51 (m)	7,47 (t)	7,56 (td)
H6	1	8,66 (d)	7,99 – 7,94 (m)	8,62 (d)	7,99 – 7,94 (m)	8,64 (d)	8,05 (d)
H10 e H14	2	7,93 (m)	7,99 – 7,94 (m)	7,92 (m)	7,99 – 7,94 (m)	8,19 (d)	8,33 – 8,16 (m)
H11 e H13	2	7,54 (d)	7,39 (t)	7,60 (d)	7,44 – 7,51 (m)	8,38 (d)	8,33 – 8,16 (m)
H12	1	7,61 (m)	7,57 – 7,47 (m)	---	---	---	---
H15	3	2,46 (s)	3,16 (s)	2,50 (s)	3,34 (s)	2,50 (s)	3,40 (s)
A	DEPT	H2AcPh	4	H2AcpClPh	5	H2AcpNO ₂ Ph ³	6
C2	---	143,4	160,1	144,4	160,0	149,1	159,8
C3	↑	120,3	126,2	120,4	126,5	120,4	127,0
C4	↑	136,5	141,9	136,4	142,0	136,6	142,1
C5	↑	124,0	128,8	124,2	129,0	124,3	129,4
C6	↑	148,5	152,1	148,6	152,2	148,6	152,5
C(7)=N	---	155,0	162,2	155,0	163,0	154,8	164,9
C(8)=O	---	162,5	181,2	163,2	180,1	162,7	179,0
C9	---	131,5	129,9	132,7	128,6	134,1	135,3
C10 e C14	↑	128,2	128,5	130,2	130,5	129,5	130,1
C11 e C13	↑	128,2	128,7	128,3	128,7	123,3	123,7
C12		133,9	132,5	136,6	137,3	139,6	149,4
C15	↑	22,1	15,0	12,5	15,1	12,8	15,4



^a multiplicidade: s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; td = triploduplete;

^b ↑ representa o símbolo convenção no DEPT 135 para CH e CH₃.

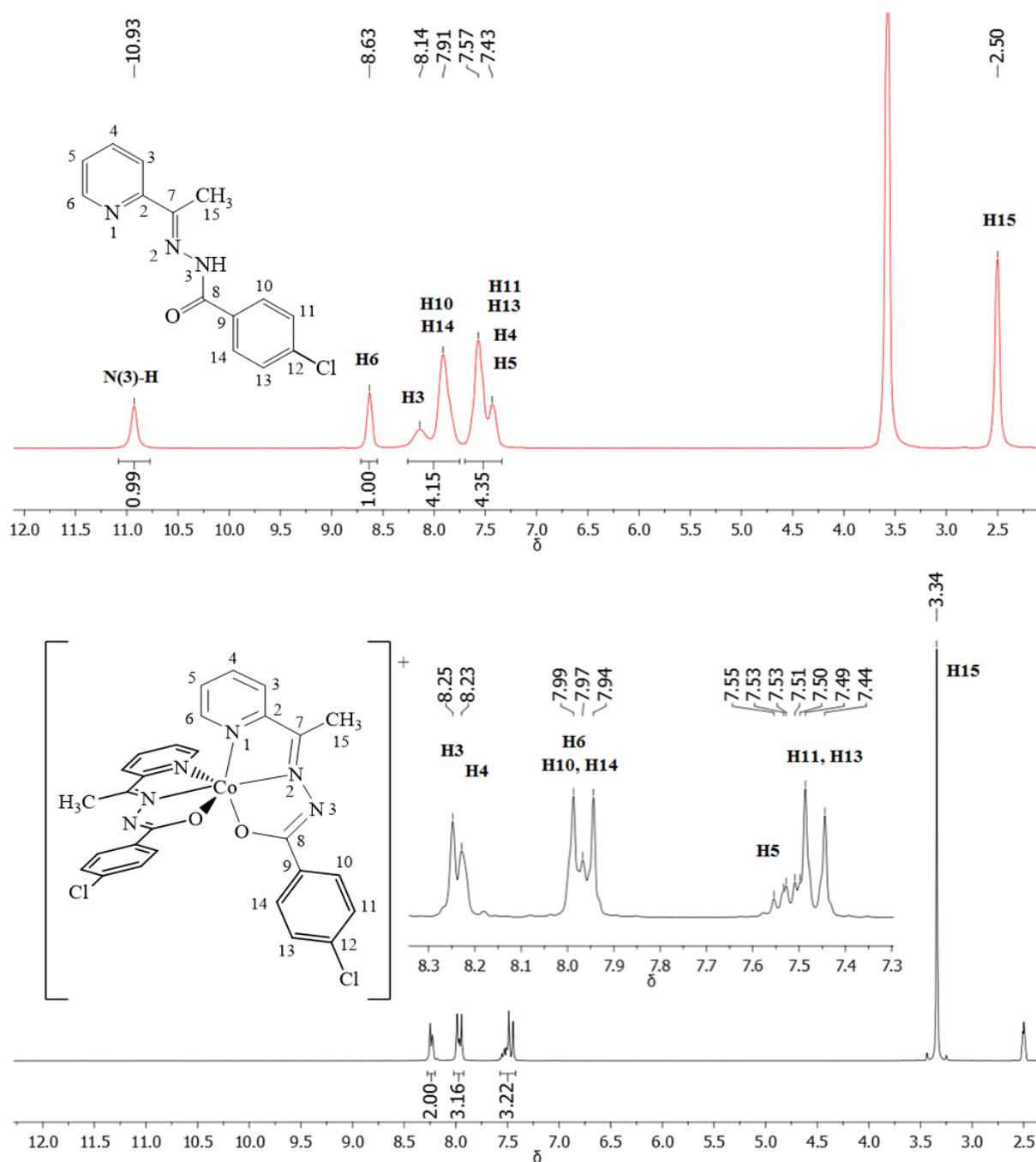


Figura 4.2 Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) do ligante H₂AcpCIPh (acima) e seu complexo [Co(2AcpCIPh)₂]Cl·3,5H₂O (**5**).

Os espectros de RMN de ¹H do complexo (**5**) e da hidrazona precursora estão apresentados na Figura 4.2. No espectro do complexo podemos observar a ausência do sinal do hidrogênio N(3)-H, o que está de acordo com a desprotonação da hidrazona após coordenação. O sinal referente ao hidrogênio H6, em 8,63 ppm no espectro da hidrazona, desloca-se para região de menor frequência após a complexação e aparece, juntamente com os sinais de hidrogênios do grupo fenil, em um multiplete em torno de 7,99 - 7,94 ppm. Os demais sinais

do anel piridínico deslocam-se para a região de maior frequência. Os deslocamentos desses sinais indicam a coordenação do metal *via* átomo de nitrogênio heteroarômico. O deslocamento do sinal de hidrogênio do grupo C(15)-H, de 2,50 para 3,34 ppm, indica a coordenação *via* átomo de nitrogênio imínico. Os complexos (5) e (6) se comportam de maneira semelhante.

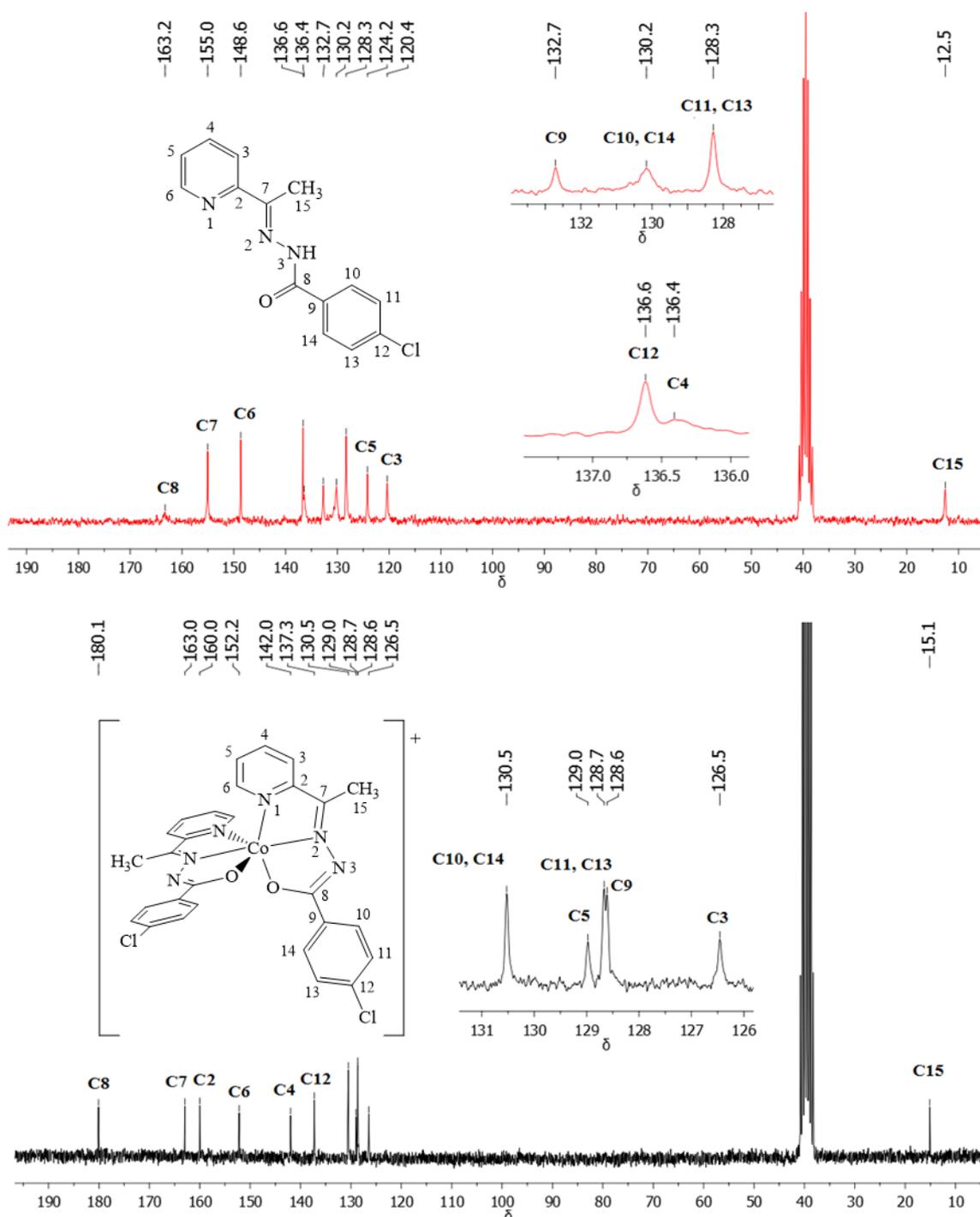


Figura 4.3 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, DMSO-d_6) do ligante $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ (acima) e seu complexo $[\text{Co}(\text{2AcpClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (5).

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ das hidrazonas também foi possível observar um deslocamento significativo dos sinais do carbono azometino (C7), dos carbonos próximos ao nitrogênio da piridina (C2-C6) e do oxigênio enolato (C8), após a complexação (Tabela 4.2). Todos os dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ são consistentes com o modo de coordenação $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imina}}\text{-O}_{\text{enolato}}$ proposto para as hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina. Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo (5) e do ligante livre ($\text{H}_2\text{AcpClPh}$) estão apresentados na Figura 4.3.

4.1.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Na Tabela 4.3 estão apresentados os números de onda máximos das bandas mais importantes observadas nos espectros vibracionais das hidrazonas livres e seus complexos de cobalto(III) na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os espectros da hidrazona $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ e do complexo (5) com marcação das principais bandas estão apresentados na Figura 4.4.

Tabela 4.3 Número de onda / cm^{-1} das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos (4-6) e hidrazonas livres

Compostos	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=N3})$	$\rho(\text{py})$
H_2AcPh	---	3181	1655	1603	---	620
$[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4)	3400	---	---	1602	1498	662
$\text{H}_2\text{AcpClPh}$	---	3287	1658	1606	---	624
$[\text{Co}(\text{2AcpClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (5)	3392	---	---	1600	1498	662
$\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph}$	---	3188	1675	1601	---	619
$[\text{Co}(\text{2AcpNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (6)	3454, 3390	---	---	1604	1488	662

Nos espectros dos ligantes são observadas bandas em torno de 3181 – 3287 e 1655 – 1675 cm^{-1} as quais foram atribuídas aos estiramentos dos grupos N-H e C=O, respectivamente.⁶ Essas bandas desaparecem nos espectros dos complexos, indicando que a hidrazona se coordena na forma aniônica. Devido à desprotonação da hidrazona, surge uma banda nova em torno de 1488 – 1498 cm^{-1} associada ao modo vibracional $\nu[\text{C=N}(3)]$. Os modos vibracionais $\nu(\text{C=N}_{\text{imina}})$ e $\nu(\text{C=N})$ do anel piridínico aparecem como uma banda fraca em torno de 1601-1606 cm^{-1} no ligante livre. Esta banda não sofreu deslocamento significativo após a complexação.

⁶ K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds* Part B. 6th ed. New York: Wiley, 2009.

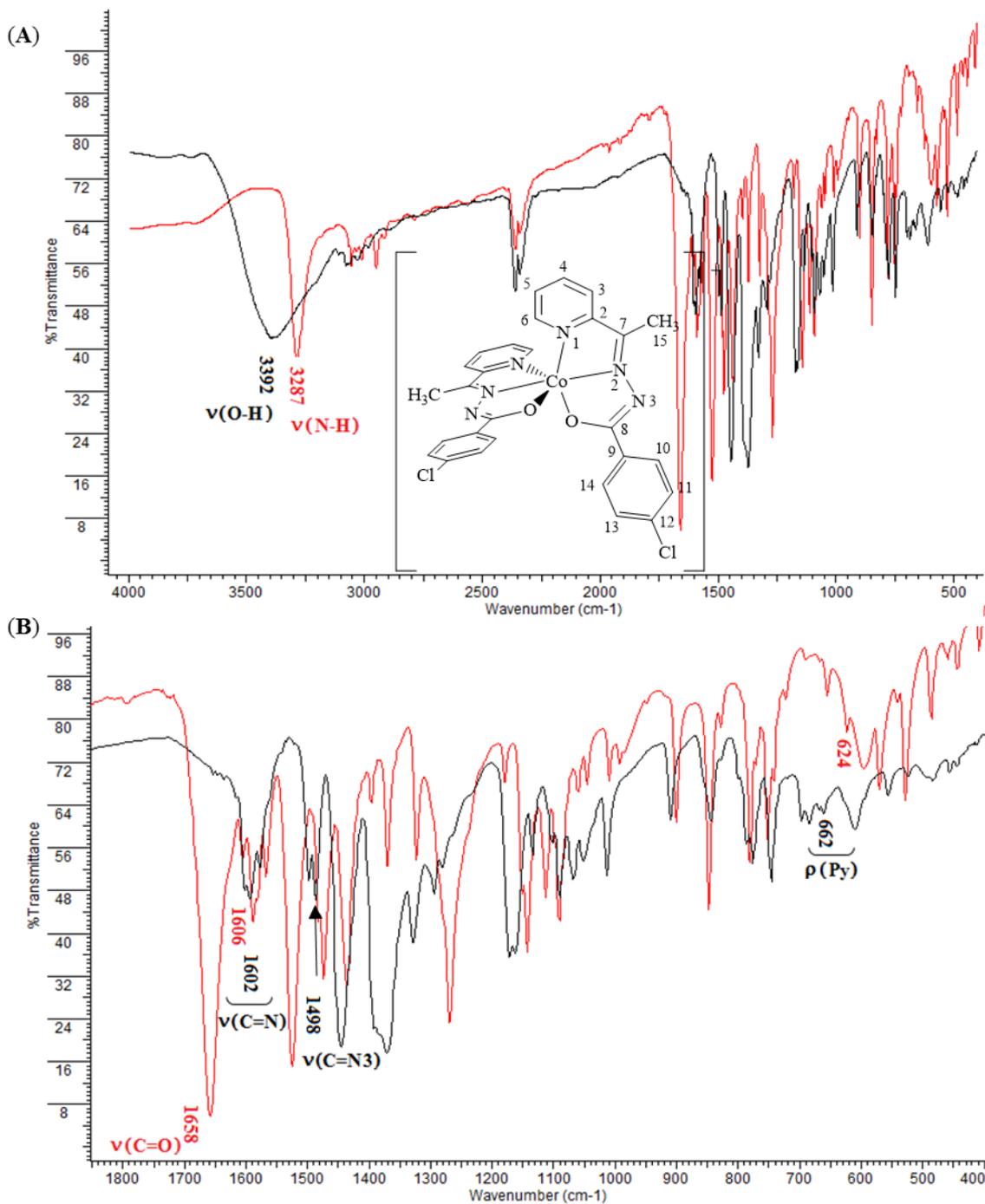


Figura 4.4 Espectros de absorção da região do infravermelho do complexo (5) e da hidrazona H2AcpClPh (vermelho), obtidos em pastilha de KBr. Região de 4000 a 400 cm⁻¹ (A) e região expandida (1800 a 400 cm⁻¹) (B).

Nos espectros dos complexos (4-6) a banda correspondente à deformação no plano do anel piridínico em torno de 662 cm⁻¹ aparece deslocada para maior número de onda em relação ao ligante livre (619 – 624 cm⁻¹), sugerindo a coordenação da hidrazona *via* átomo de nitrogênio

heteroaromático.^{3,7,8} Desta forma, os dados obtidos através dos espectros de infravermelho indicam a coordenação tridentada das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina através do sistema quelato N_{py}-N_{imina}-O_{enolato}.

Bandas de estiramento da ligação O-H em 3400 e 3392 cm⁻¹ para os complexos (4) e (5), respectivamente, indicam a presença de água de hidratação.⁹ No espectro do complexo (6) foi possível observar duas bandas associadas a essa ligação: estiramentos simétrico (3390 cm⁻¹) e assimétrico (3454 cm⁻¹).

4.1.1.4 Cristalografia de raios X

Monocristais do complexo [Co(2AcPh)₂]ClO₄·0,5H₂O·0,5DMSO (4a) adequados para a difração de raios X foram obtidos após a recristalização do composto [Co(2AcPh)₂]ClO₄ à temperatura ambiente em DMSO-d₆ (ver seção 2.2.4, pag. 29).

Medidas de difração de raios X do cristal foram realizadas em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI (LabCri) com fonte de grafite Mo K α ($\lambda = 0,71070 \text{ \AA}$). Os dados foram coletados a baixa temperatura (190 K), utilizando o programa CrysAlisPro¹⁰ versão 1.171.35.21 - Agilent Technologies. A estrutura foi resolvida por métodos diretos e refinada pelo método de mínimos quadrados F^2 utilizando programas SHELX.¹¹ O gráfico da estrutura molecular foi obtido utilizando o programa ORTEP.¹²

O complexo (4a) cristalizou-se no sistema monoclinico (grupo espacial P2₁/n) com duas moléculas [Co(2AcPh)₂]ClO₄ por unidade assimétrica. A estrutura cristalina do complexo (4a) está apresentada na Figura 4.5. A unidade assimétrica do cristal contém uma molécula de água e um DMSO desordenado como solventes de cristalização. O metal apresenta uma coordenação octaédrica em ambos os complexos [Co(2AcPh)₂]⁺, com ângulos de ligação Co de 82 ° [Co(1)] e 98 ° [Co(51)]. Como mencionado anteriormente, as hidrazonas adotam uma configuração *E* em relação à ligação C(7)=N(2) e se coordenam na forma aniônica através dos átomos de nitrogênio piridínico [N(1) e N(21)], nitrogênio imínico [N(2) e N(22)] e oxigênio [O(10) e O(20)].

⁷ D. West, I. Billeh, J. P. Jasinski, J. M. Jasinski, R. J. Butcher, *Transition Met. Chem.* 23 (1998) 209.

⁸ 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.

⁹ D. L. Pávia; G. M. Lampman; G. S. Kriz; J. R. Vyvyan. *Introduction to Spectroscopy*. 4ª ed. United States of America: Brooks/Cole, 656p, 2009.

¹⁰ Oxford Diffraction, CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (release 20-01-2012 CrysAlis171 .NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England (2010).

¹¹ G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* C71 (2015) 3.

¹² L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849.

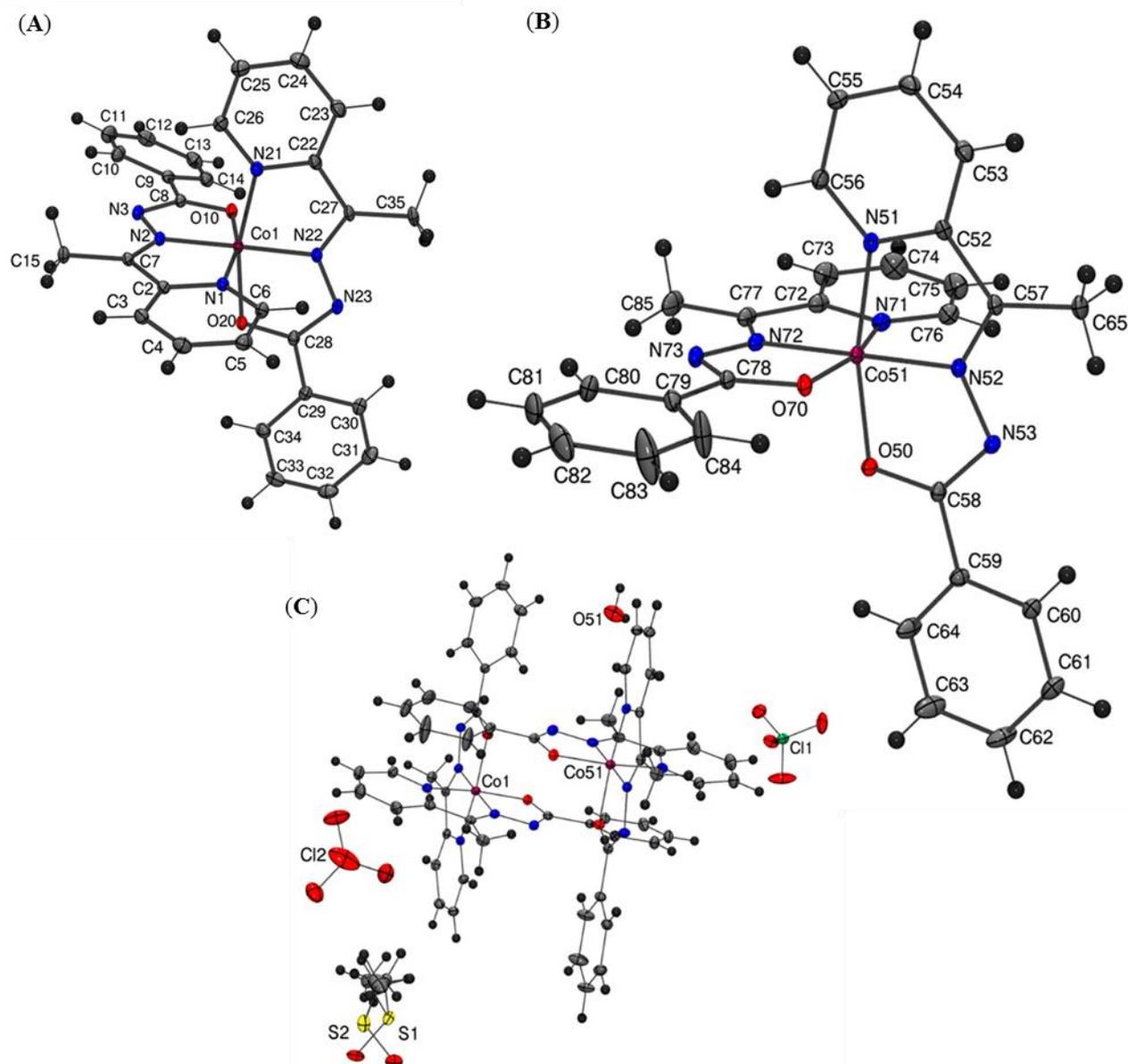


Figura 4.5 Diagramas ORTEP: molécula [1] (A), molécula [2] (B) e unidade assimétrica de $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{ClO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O} \cdot 0,5\text{DMSO}$ (**4a**) (C).

Apesar da coordenação octaédrica similar, o ligante H2AcPh nas duas moléculas $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]^+$ são ligeiramente diferentes. Para molécula [1], contendo Co(1), os dois ligantes H2AcPh são quase planares, com ângulos entre o plano equatorial e o plano formado pelo sistema quelante da hidrazona iguais a $3,42(4)$ e $5,39(9)^\circ$, respectivamente. Por outro lado, para a molécula [2], contendo Co(51), os ângulos entre esses dois planos são bem maiores, $18,93(7)$ e $9,93(5)^\circ$. Isto se deve à presença de dois complexos $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{ClO}_4$ independentes na unidade assimétrica do cristal (Figura 4.5 C).

Na Tabela 4.4 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina do complexo (**4a**), bem como da hidrazona H2AcPh previamente descrita

na literatura.¹ Os valores de comprimentos e ângulos de ligação estão apresentados na Tabela 4.5. Os dados discutidos nos próximos parágrafos serão referentes à molécula [1] do complexo (4a).

Tabela 4.4 Resumo da coleção de dados cristalográficos e resultados do refinamentos das estruturas cristalográficas da hidrazona H2AcPh¹ e do complexo [Co(2AcPh)₂]ClO₄·0,5H₂O·0,5DMSO (4a)

	H2AcPh ¹	4a
Fórmula empírica	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O	C ₅₈ H ₅₆ Cl ₂ Co ₂ N ₁₂ O ₁₄ S
Massa molecular (g mol ⁻¹)	239,27	1365,96
Temperatura (K)	200	190
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71070
Sistema cristalino, grupo espacial	ortorrômbico, Pbcn	monoclínico, P2 ₁ /n
Tamanho do cristal (mm ³)	0,40 x 0,25 x 0,15	0,31 x 0,27 x 0,18
Parâmetros da célula unitária		
a (Å)	18,888(3)	15,5298(6)
b (Å)	7,9514(7)	22,7645(6)
c (Å)	16,0749(15)	17,6442(6)
α (°)	90	90
β (°)	90	107,315(4)
γ (°)	90	90
V (Å ³) / Z	2414,3(5) / 8	5955,0(4) / 4
Densidade calculada (mg m ⁻³)	1,317	1,524
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,086	0,76
F(000)	1008	2816
Intervalo de θ (°)	---	12.1 - 29.6
Faixa de índices de Miller	---	-19 ≤ h ≤ 21
	---	-30 ≤ k ≤ 27
	---	-18 ≤ l ≤ 24
Reflexões coletadas	4041	34592
Reflexões únicas (R _{int})	1877 (0,0430)	14385 (0,029)
Completeza	---	θ = 26,32 ° (99,9 %)
Dados/restrições/parâmetros	---	11151 / 0 / 847
S	---	1,03
Índices de R final [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0370	R ₁ = 0,042; wR ₂ = 0,110
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,0370; wR ₂ = 0,0973	R ₁ = 0,0615; wR ₂ = 0,1103
Δρ _{máx} e Δρ _{mín} (e Å ⁻³)	0,143 e -0,113	0,85 e -0,50

Tabela 4.5 Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação da hidrazona H2AcPh¹ e do complexo [Co(2AcPh)₂]ClO₄·0,5H₂O·0,5DMSO (**4a**). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	H2AcPh ¹	4a – molécula [1]	Átomos	4a – molécula [2]
C(7)–N(2)/C(27)–N(22)	1,264(3)	1,292(3)/1,291(3)	C(57)–N(52)/C(77)–N(72)	1,292(3)/1,294(3)
N(2)–N(3)/N(22)–N(23)	1,375(2)	1,369(2)/1,371(2)	N(52)–N(53)/N(72)–N(73)	1,363(2)/1,369(3)
N(3)–C(8)/N(23)–C(28)	1,347(3)	1,325(3)/1,319(3)	N(53)–C(58)/N(73)–C(78)	1,324(3)/1,328(3)
C(8)–O(10)/C(28)–O(20)	1,219(2)	1,299(2)/1,299(2)	C(58)–O(50)/C(78)–O(70)	1,297(2)/1,301(2)
N(1)–C(2)/N(21)–C(22)	1,325(3)	1,369(3)/1,370(3)	N(51)–C(52)/N(71)–C(72)	1,367(3)/1,369(3)
C(2)–C(7)/C(22)–C(27)	1,487(2)	1,464(3)/1,459(3)	C(52)–C(57)/C(72)–C(77)	1,463(3)/1,464(3)
Co(1)–N(1)/Co(1)–N(21)	---	1,918(18)/1,926(18)	Co(51)–N(51)/Co(51)–N(71)	1,916(17)/1,915(18)
Co(1)–N(2)/Co(1)–N(22)	---	1,854(16)/1,854(16)	Co(51)–N(52)/Co(51)–N(72)	1,850(16)/1,852(17)
Co(1)–O(10)/Co(1)–O(20)	---	1,900(15)/1,903(15)	Co(51)–O(50)/Co(51)–O(70)	1,898(14)/1,893(15)
C(2)–C(7)–N(2)/C(22)–C(27)–N(22)	114,47(15)	111,41(18)/111,64(18)	C(52)–C(57)–N(52)/C(72)–C(77)–N(72)	111,44(17)/111,70(18)
C(7)–N(2)–N(3)/C(27)–N(22)–N(23)	119,02(14)	123,39(17)/123,39(17)	C(57)–N(52)–N(53)/C(77)–N(72)–N(73)	123,50(17)/124,12(18)
N(2)–N(3)–C(8)/N(22)–N(23)–C(28)	117,02(13)	106,83(16)/107,17(16)	N(52)–N(53)–C(58)/N(72)–N(73)–C(78)	107,17(16)/107,27(16)
N(3)–C(8)–O(10)/N(23)–C(28)–O(20)	123,32(15)	124,2(2)/124,4(2)	N(53)–C(58)–O(50)/N(73)–C(78)–O(70)	124,25(19)/123,8(2)
N(1)–Co(1)–N(21)	---	92,13(7)	N(51)–Co(51)–N(71)	90,70(7)
N(1)–Co(1)–N(22)	---	97,82(7)	N(51)–Co(51)–N(72)	96,76(7)
N(1)–Co(1)–O(10)/N(21)–Co(1)–O(20)	---	164,67(7)/164,66(7)	N(51)–Co(51)–O(50)/N(71)–Co(51)–O(70)	165,13(7)/165,70(7)
N(2)–Co(1)–N(22)	---	178,81(8)	N(52)–Co(51)–N(72)	178,07(8)
N(2)–Co(1)–O(20)	---	96,74(7)	N(52)–Co(51)–O(70)	95,67(7)
O(10)–Co(1)–O(20)	---	90,22(7)	O(50)–Co(51)–O(70)	90,51(7)
O(10)–Co(1)–N(21)	---	91,62(7)	O(50)–Co(51)–N(71)	91,80(7)
O(10)–Co(1)–N(22)	---	97,41(7)	O(50)–Co(51)–N(72)	98,08(7)

Como demonstrado anteriormente por outros autores,¹ a hidrazona adota a conformação *EZ* com relação as ligações C(7)=N(2) e N(3)–C(8). Comparando-se as distâncias de ligação obtidas para o complexo (**4a**) com a hidrazona H2AcPh (Tabela 4.5), podemos verificar o alongamento das ligações C(7)–N(2), N(1)–C(2) e C(8)–O(10), as quais passam de 1,264(3), 1,325(3) e 1,219(2) Å (H2AcPh) para 1,292(3), 1,369(3) e 1,299(2) Å [complexo (**4a**)]. Além disso, o encurtamento das ligações N(3)–C(8), C(2)–C(7) e N(3)–N(2) do ligante livre [1,347(3), 1,487(2) e 1,375(2) Å] para o complexo (**4a**) [1,325(3), 1,487(2) e 1,375(2) Å] foi observado. Estas variações estão de acordo com a desprotonação de N(3)–H e formação de um sistema altamente deslocalizado, onde N(3)–C(8) adquire um caráter de dupla ligação e C(8)–O(10) adquire um caráter de ligação simples. A distância de ligação entre o átomo de cobalto e o átomo de nitrogênio imínico [1,8541(17) Å] é menor do que a distância de ligação entre o átomo de cobalto e o átomo de nitrogênio da piridina [1,9183(18) Å].

Os ângulos das ligação N(1)–Co(1)–O(10) [16,67(7)°] desviam do valor ideal de 180°, provavelmente devido ao requerimento espacial exigido pelo sistema quelante da hidrazona. Por outro lado, o ângulo envolvendo as duas moléculas de H2AcPh em torno do centro metálico, N(2)–Co(1)–N(22), é 178,81(8)°. Além disso, como foi observado anteriormente, ocorre uma rotação em torno da ligação C(2)–C(7) quando a hidrazona se coordena a um centro metálico, ocasionando mudanças significativas em alguns ângulos de ligação.³ Como mostrado na Tabela 4.5, os ângulos de ligação mudam de 117,02(13) para 106,83(16)° [C(8)–N(3)–N(2)], de 119,02(14) para 123,39(17)° [C(7)–N(3)–N(2)] e de 114,47(15) para 111,41(18)° [C(2)–C(7)–N(2)], com a complexação.

4.1.2 Caracterização dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas

Foram obtidos complexos de cobalto(III) com H2Ac4Ph, H2Ac4*p*ClPh, H2Ac4*o*ClPh, H2Ac4*p*NO₂Ph e H2Ac4*o*NO₂Ph: [Co(2Ac4Ph)₂]Cl·CH₃OH·0,5H₂O (**7**), [Co(2Ac4*p*ClPh)₂]Cl·1,5H₂O (**8**), [Co(2Ac4*o*ClPh)₂]Cl·3,5H₂O (**9**), [Co(2Ac4*p*NO₂Ph)₂]Cl·3H₂O (**10**) e [Co(2Ac4*o*NO₂Ph)₂]Cl·3H₂O (**11**) (Figura 4.6). Destes cinco complexos apenas o complexo (**7**) não é inédito.¹³ Os dados obtidos por meio da caracterização do complexo (**7**) estão de acordo com os dados relatados na literatura.

¹³ C. G. Oliveira, P. I. S. Maia, M. Miyata, F. R. Pavan, C. Q. F. Leite, E. T. De Almeida, V. M. Deflon, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 1848.

As tiossemicarbazonas utilizadas na síntese dos complexos já foram descritas na literatura.¹⁴⁻¹⁷ Sendo assim, os espectros das mesmas são utilizados neste capítulo apenas para comparação com os espectros dos seus respectivos complexos.

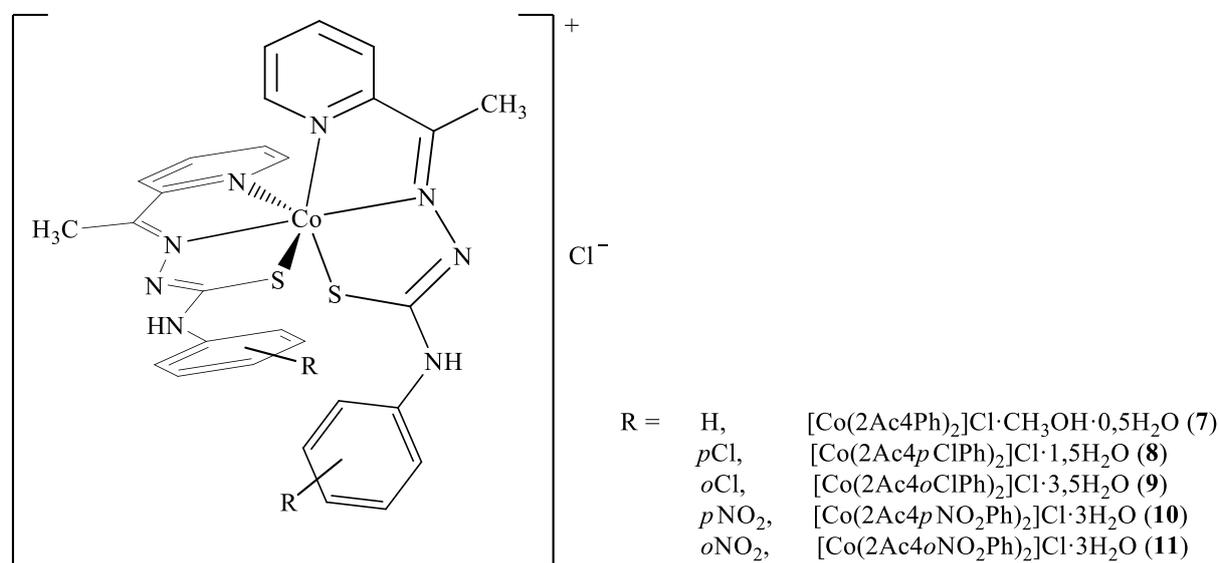


Figura 4.6 Estrutura genérica dos complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas.

4.1.2.1 Análises

Rendimento das reações, massas molares, microanálises e condutividade molar dos complexos (7-11) estão apresentados na Tabela 4.6. Os resultados das análises estão de acordo com a estrutura proposta, [Co(L)₂]Cl·xH₂O, na qual um átomo de cobalto se coordena a duas moléculas de tiossemicarbazona na sua forma aniônica (L⁻) e um cloreto age como contra-íon. As moléculas de água de hidratação e do metanol [no caso do complexo (7)] foram confirmadas por espectroscopia na região do infravermelho e também por análises termogravimétricas, onde verifica-se a perda de massa equivalente a essas moléculas entre 30 e 150 °C.

A presença do íon cloreto como contra-íon foi confirmada pelos valores de condutividade molar em torno de 47,62 – 57,32 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹, sugerindo que todos os compostos são eletrólitos 1:1 em DMF (Tabela 2.1, pag. 24). As medidas de susceptibilidade magnética (χ) dos complexos (7-11) resultaram em valores de χ_g próximos a zero, indicando a presença de um composto diamagnético, íon cobalto(III) (baixo spin, d⁶).

¹⁴ D. L. Klayman, J. F. Bartosevich, T. S. Griffin, C. J. Mason, J. P. Scovill, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 855.

¹⁵ E. Bermejo, A. Castiñeiras, R. Domínguez, R. Carballo, C. Maichle-Mossmer, J. Strahle, D. X. West, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 625 (1999) 961.

¹⁶ D. X. West, J. J. Ingram III, N. M. Kozub, G. A. Bain, A. E. Liberta, *Transition Met. Chem.* 21 (1996) 213.

¹⁷ J. A. Lessa, I. C. Mendes, P. R. O. Da Silva, M. A. Soares, R. G. Dos Santos, N. L. Speziali, N. C. Romeiro, E. J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671.

Tabela 4.6 Rendimento, temperatura de fusão ou decomposição^a, análise elementar^b, termogravimetria^b, massa molar e condutividade molar (DMF, 1 mM) dos complexos [Co(2Ac4Ph)₂]Cl·CH₃OH·0,5H₂O (**7**), [Co(2Ac4*p*ClPh)₂]Cl·1,5H₂O (**8**), [Co(2Ac4*o*ClPh)₂]Cl·3,5H₂O (**9**), [Co(2Ac4*p*NO₂Ph)₂]Cl·3H₂O (**10**) e [Co(2Ac4*o*NO₂Ph)₂]Cl·3H₂O (**11**)

Compostos	Rend. / %	T _f ou T _{dec} / °C	% C	% H	% N	TG / %	MM / g mol ⁻¹	Λ _M / cm ² Ω ⁻¹ mol ⁻¹
7	77,0	306,0 - 308,0	51,53	4,96	17,07	5,84	674,13	57,32
		(175,0 - 177,0)	(51,67)	(4,64)	(16,62)	(6,09)		
8	69,6	264,2 (dec.)	46,16	3,98	15,28	7,74	728,99	55,72
		(162,7 - 164,9)	(46,13)	(3,73)	(15,37)	(7,41)		
9	85,4	251,7 (dec.)	43,25	3,83	14,50	8,03	765,02	62,92
		(149,5 - 152,0)	(43,96)	(4,08)	(14,65)	(8,24)		
10	86,0	280,0 (dec.)	43,32	3,62	18,09	7,03	777,12	47,62
		(193,0 - 195,0)	(43,28)	(3,89)	(18,02)	(6,96)		
11	61,8	252,0 - 253,5	43,38	3,69	18,37	6,93	777,12	50,72
		(150,9 - 154,9)	(43,28)	(3,89)	(18,02)	(6,95)		

^a Faixa de temperatura de fusão dos respectivos ligantes entre parênteses (dec = decomposição);

^b valores teóricos entre parênteses;

4.1.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os complexos (**7-11**) foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, DEPT 135, COSY e HMQC, utilizando-se DMSO-*d*₆ como solvente. Os espectros de RMN dos complexos e das tiossemicarbazonas livres foram obtidos no equipamento de 200 MHz. A numeração adotada para a atribuição dos átomos de H e C e os resultados obtidos estão apresentadas nas Tabelas 4.7 e 4.8. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C{¹H} do complexo (**9**) serão apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8.

Os espectros de RMN de ¹H de todas as tiossemicarbazonas apresentam sinais duplicados, indicando a existência dos isômeros configuracionais *Z* e *E* (88 - 95%) em solução.^{17,18} Para as tiossemicarbazonas H2Ac4*p*ClPh, H2Ac4*o*ClPh e H2Ac4*o*NO₂Ph o sinal do isômero *Z* aparece em torno de 14,84 – 14,16 ppm,^{17,18} sendo este característico de N(3)-H em ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do anel da piridina.¹⁹ Já no isômero *E*, N(3)-H faz ligação de hidrogênio com o solvente²⁰ (DMSO) e o sinal foi observado em torno

¹⁸ 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.

¹⁹ A. M. B. Bastos, A. F. C. Alcântara, H. Beraldo, *Tetrahedron* 61 (2005) 7045.

²⁰ 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.

de 11,18 – 10,61 ppm (Tabela 4.7). Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ não foi possível observar a coexistência dos isômeros *Z* e *E* devido à baixa solubilidade desses compostos em DMSO- d_6 .

Nos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (7 – 11) foi observado apenas um sinal para cada hidrogênio e cada carbono, indicando a presença de um único isômero, a forma *E*. A configuração *E* das tiossemicarbazonas coordenadas foi confirmada pela estrutura de raios X dos complexos (7)¹³ e (8). A estrutura cristalográfica do complexo (8) será apresentada na seção 4.1.2.4 (pag. 91).

Nos espectros de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas foram observados sinais em torno de 10,61 - 11,18 e 10,21 – 11,04 ppm referentes aos hidrogênios N(3)-H e N(4)-H, respectivamente. A ausência do sinal do N(3)-H nos espectros dos complexos indica que os ligantes encontram-se na sua forma aniônica. O deslocamento dos hidrogênios da piridina e do grupo acetil indicam a coordenação *via* átomos de nitrogênio piridínico e imínico. Na Figura 4.7 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H do complexo (9) e da tiossemicarbazona precursora (H2Ac4*p*NO₂Ph).

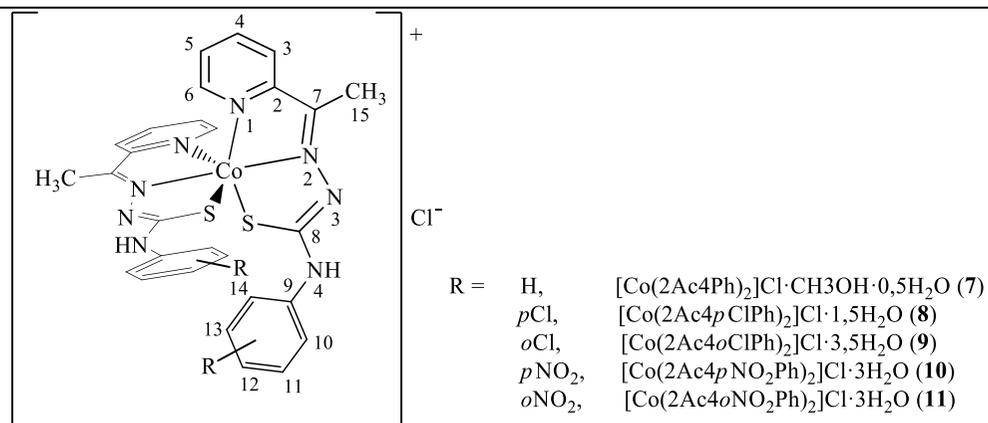
Em concordância com os dados de RMN de ^1H , deslocamentos significativos foram observados nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ das tiossemicarbazonas após a complexação (Tabela 4.8). O sinal do carbono C7 observado em torno de 148,7 – 150,6 ppm no espectro das tiossemicarbazonas livres se deslocou para 156,4 – 156,9 ppm nos espectros dos complexos, confirmando o envolvimento do nitrogênio imínico na coordenação ao centro metálico. Os sinais de carbono da piridina (C2-C6) e do grupo acetil (C15) também se deslocaram. Apesar da coordenação do íon cobalto ao átomo de enxofre, não foi observado deslocamento significativo do carbono C8. Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo (9) e do ligante precursor (H2Ac4*o*ClPh) estão apresentados na Figura 4.8.

Tabela 4.7 Atribuições (A), número de hidrogênio (N°), multiplicidade^a, deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹H dos complexos (7-11) e tiossemicarbazonas livres (200 MHz, DMSO-d₆)

		δ					
A	N°	H2Ac4Ph	7	H2Ac4 <i>p</i> ClPh	8	H2Ac4 <i>o</i> ClPh	9
N(3)-H	1	10,61 (s)	---	10,79 (s)	---	10,94 (s)	---
N(4)-H	1	10,22 (s)	10,51 (s)	10,22 (s)	10,54 (s)	10,21 (s)	10,13 (s)
H3	1	8,48 (d)	8,21 – 8,10 (m)	8,53 (d)	8,22 – 8,10 (m)	8,51 (d)	8,17 – 8,07 (m)
4	1	7,81 (t)	8,21 – 8,10 (m)	7,82 (t)	8,22 – 8,10 (m)	7,87 – 7,73 (m)	8,17 – 8,07 (m)
H5	1	7,45 – 7,30 (m)	7,51 (td)	7,50 -7,35 (m)	7,55 – 7,40 (m)	7,87 – 7,73 (m)	7,57 – 7,48 (m)
H6	1	8,58 (d)	8,01 (d)	8,61 (d)	8,02 (d)	8,62 (d)	8,00 (d)
H10	1	7,53 (d)	7,74 (d)	7,50 -7,35 (m)	7,40 – 7,55 (m)	---	---
H11	1	7,45 – 7,30 (m)	7,37 (t)	7,61 (d)	7,75 (d)	7,56 (dd)	7,57 – 7,48 (m)
H12	1	7,22 (dd)	7,08 (t)	---	---	7,44 – 7,28 (m)	7,37 (td)
H13	1	7,45 – 7,30 (m)	7,37 (t)	7,61 (d)	7,75 (d)	7,44 – 7,28 (m)	7,27 (td)
H14	1	7,53 (d)	7,74 (d)	7,50 -7,35 (m)	7,40 – 7,55 (m)	7,44 – 7,28 (m)	7,57 – 7,48 (m)
H15	3	2,44 (s)	3,00 (s)	2,47 (s)	3,00 (s)	2,53 (s)	2,81 (s)

Tabela 4.7 Continuação...

		δ			
A	N°	H2Ac4 <i>p</i> NO ₂ Ph	10	H2Ac4 <i>o</i> NO ₂ Ph	11
N(3)-H	1	11,10 (s)	---	11,18 (s)	---
N(4)-H	1	10,50 (s)	11,07 (s)	11,04 (s)	10,78 (s)
H3	1	8,49 (d)	8,32 – 8,27 (m)	8,46 (d)	7,60 – 7,51 (m)
H4	1	7,86 (td)	8,18 (t)	8,00 – 7,70 (m)	8,20 – 8,13 (m)
H5	1	7,44 (t)	7,56 (t)	7,60 – 7,35 (m)	7,60 – 7,51 (m)
H6	1	8,63 (d)	8,08 (d)	8,63(d)	7,89 (d)
H10	1	8,02 (d)	8,02 (d)	---	---
H11	1	8,26 (d)	8,30 (d)	8,29 (d)	8,20 – 8,13 (m)
H12	1	---	---	8,00 – 7,70 (m)	7,74 (td)
H13	1	8,26 (d)	8,30 (d)	7,60 – 7,35 (m)	7,42 (td)
H14	1	8,02 (d)	8,02 (d)	8,13 (d)	8,02 (dd)
H15	3	2,50 (s)	3,08 (s)	2,50 (s)	2,75 (s)



^a multiplicidade: s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; td = triploduplete;

Tabela 4.8 Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 dos complexos (7-11) e tiossemicarbazonas livres (50 MHz, DMSO- d_6)

		δ									
A	DEPT	H2Ac4Ph	7	H2Ac4pClPh	8	H2Ac4oClPh	9	H2Ac4pNO ₂ Ph	10	H2Ac4oNO ₂ Ph	11
C2	---	154,7	158,8	154,4	159,6	154,9	157,6	154,2	162,2	154,2	159,6
C3	↑	125,8	125,6	121,2	126,1	121,0	125,4	121,3	126,5	120,9	125,9
C4	↑	136,6	140,2	136,3	140,4	136,5	140,2	136,4	140,5	136,7	140,4
C5	↑	121,5	127,5	124,1	127,7	124,2	127,6	124,3	128,2	124,4	127,6
C6	↑	149,4	149,3	148,4	149,4	148,6	149,3	148,9	149,7	148,6	149,3
C(7)=N	---	148,7	156,7	149,5	156,6	149,3	156,9	150,6	156,4	150,1	156,6
C(8)=S	---	177,5	175,5	177,2	175,4	177,8	178,9	176,6	175,3	177,1	176,7
C9	---	139,2	140,0	138,0	138,9	130,6	129,4	145,3	145,7	135,7	132,8
C(10)-R	↑	126,3	128,8	---	128,7	136,6	136,4	---	125,0	143,1	143,2
C11	↑	128,3	120,4	---	121,8	127,8	127,9	---	119,7	133,9	134,0
C(12)-R	↑	125,9	123,4	129,5	127,0	129,3	128,6	143,5	141,7	128,6	125,9
C13	↑	128,4	120,4	---	121,8	127,2	127,2	---	119,7	125,0	125,9
C14	↑	126,3	128,8	---	128,7	129,7	129,8	---	125,0	119,2	125,3
C15	↑	12,7	15,8	12,5	15,9	12,6	15,3	12,78	16,4	12,8	15,3

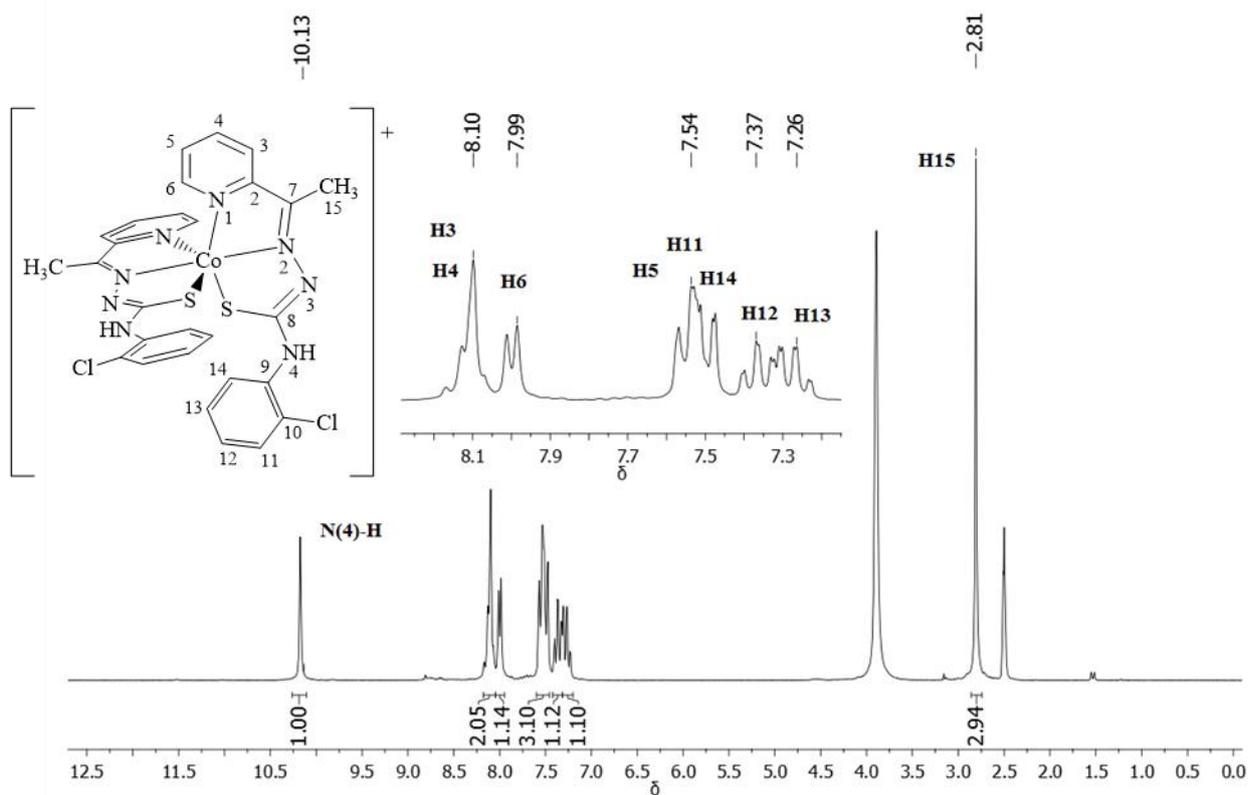
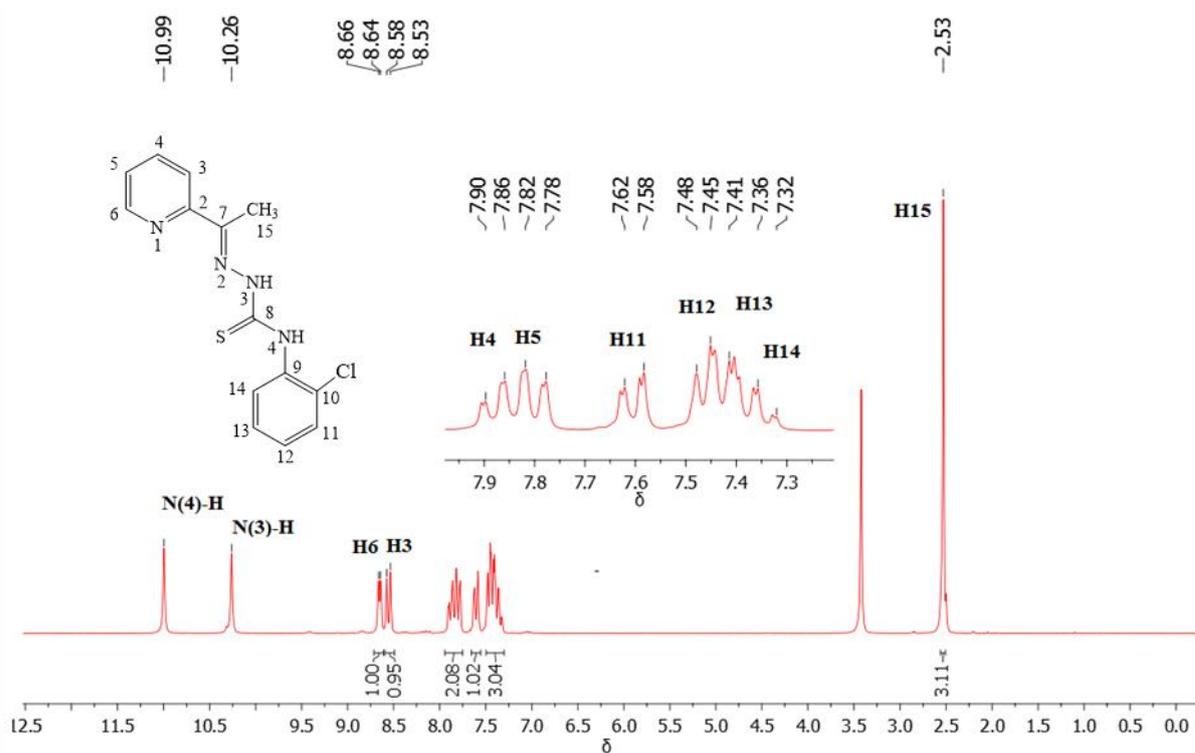


Figura 4.7 Espectros de RMN de 1H (200 MHz, $DMSO-d_6$) do ligante H_2Ac_4oCIPh (acima) e seu complexo $[Co(2Ac_4oCIPh)_2]Cl \cdot 3.5H_2O$ (9).

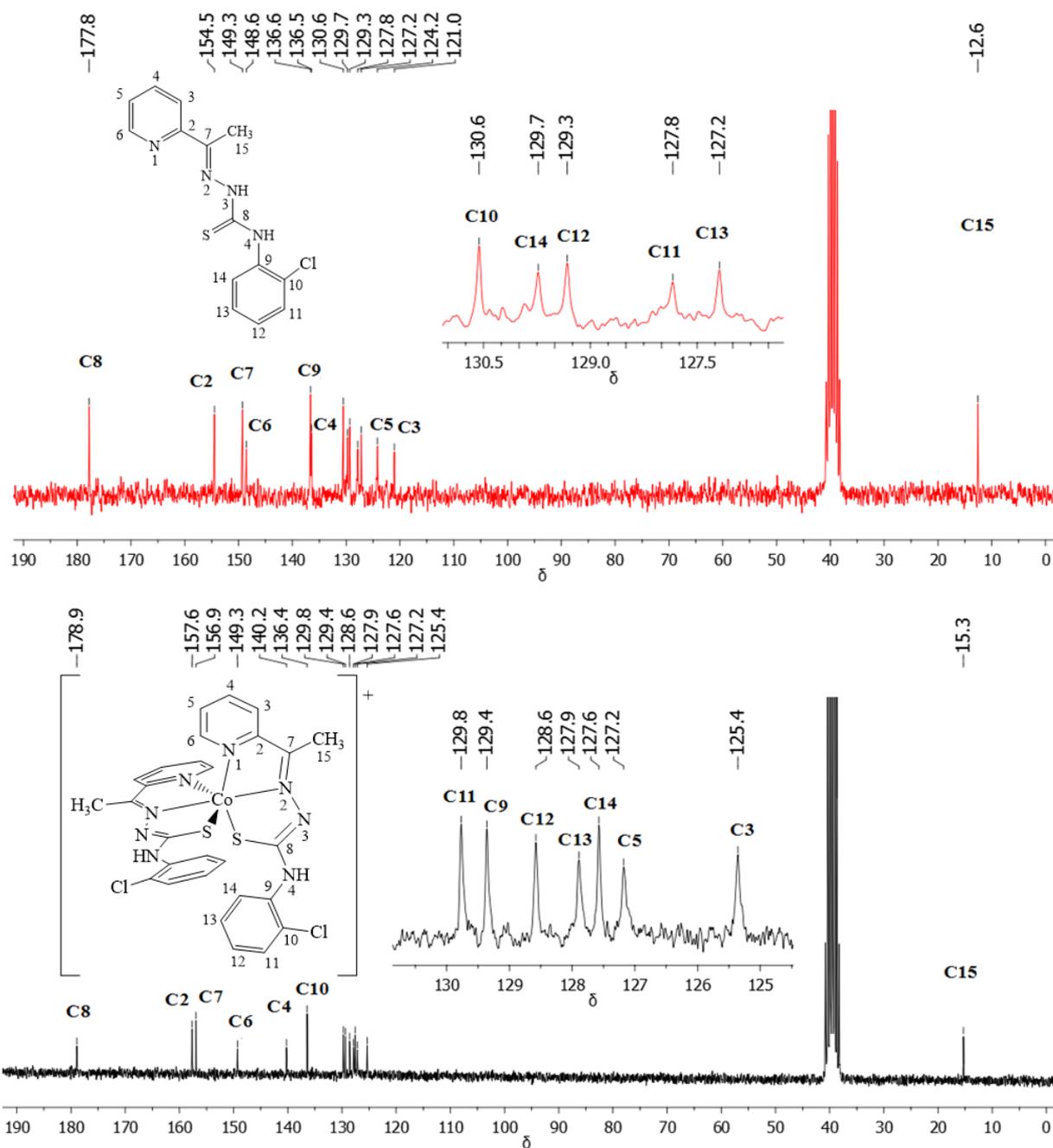


Figura 4.8 Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, DMSO-d_6) do ligante $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oCIPh}$ (acima) e seu complexo $[\text{Co}(\text{2Ac}_4\text{oCIPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**9**).

4.1.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Na Tabela 4.9 estão apresentados os números de onda máximos das bandas mais importantes observadas nos espectros vibracionais das tiossemicarbazonas livres e seus complexos de cobalto(III) na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os espectros do ligante $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oNO}_2\text{Ph}$ e do complexo (**9**) estão apresentados na Figura 4.9.

Nos espectros dos ligantes observa-se uma banda de estiramento do grupo N-H em torno de 3218 – 3320 cm^{-1} . Essa banda desaparece nos espectros dos complexos indicando a desprotonação da tiossemicarbazona após a complexação. A mudança de enxofre da formação para enxofre na forma de tiolato é verificada pelo intenso deslocamento da banda de estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ (20 a 40 cm^{-1}) para menor número de onda, indicando a formação da ligação simples C-S.^{16,21}

Tabela 4.9 Número de onda / cm^{-1} das principais bandas observadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos (7-11) e tiossemicarbazonas livres

Compostos	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{N3-H})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{N3})$	$\rho(\text{py})$
H2Ac4Ph	---	3300	800	1588	---	620
[Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7)	3408	---	756	1558	1434	656
H2Ac4pClPh	---	3292	802	1582	---	620
[Co(2Ac4pClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8)	3390	---	772	1552	1448	654
H2Ac4oClPh	---	3320, 3310	782	1582	---	620
[Co(2Ac4oClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9)	3379	---	774	1591	1435	668
H2Ac4pNO ₂ Ph	---	3258	796	1596	---	620
[Co(2Ac4pNO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (10)	3400	---	776	1596	1450	670
H2Ac4oNO ₂ Ph	---	3218	792	1582	---	620
[Co(2Ac4oNO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (11)	3336	---	778	1588	1456	654

A banda $\nu(\text{C}=\text{N})$ em torno de 1582 – 1596 cm^{-1} no ligante se desloca para 1552 – 1596 cm^{-1} nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação ao átomo de nitrogênio imínico. Além disso, observa-se uma banda nova associada ao estiramento da ligação C=N(3) em torno de 1434 – 1456 cm^{-1} , em consequência da desprotonação da tiossemicarbazona após a complexação.

A coordenação *via* nitrogênio heteroaromático é confirmada pelo deslocamento positivo da banda de deformação angular no plano do anel, de 620 cm^{-1} no espectro da tiossemicarbazona livre para 670 – 654 cm^{-1} no espectro dos complexos. Desta forma, os dados obtidos através dos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos indicam a coordenação das tiossemicarbazonas através do sistema quelato N_{py}-N_{imina}-S_{tiolato}.

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

Nos espectros dos complexos (7-11) aparece uma banda intensa e larga em torno de $3336 - 3408 \text{ cm}^{-1}$ associada ao estiramento da ligação O-H, indicando a presença de água de hidratação.⁹

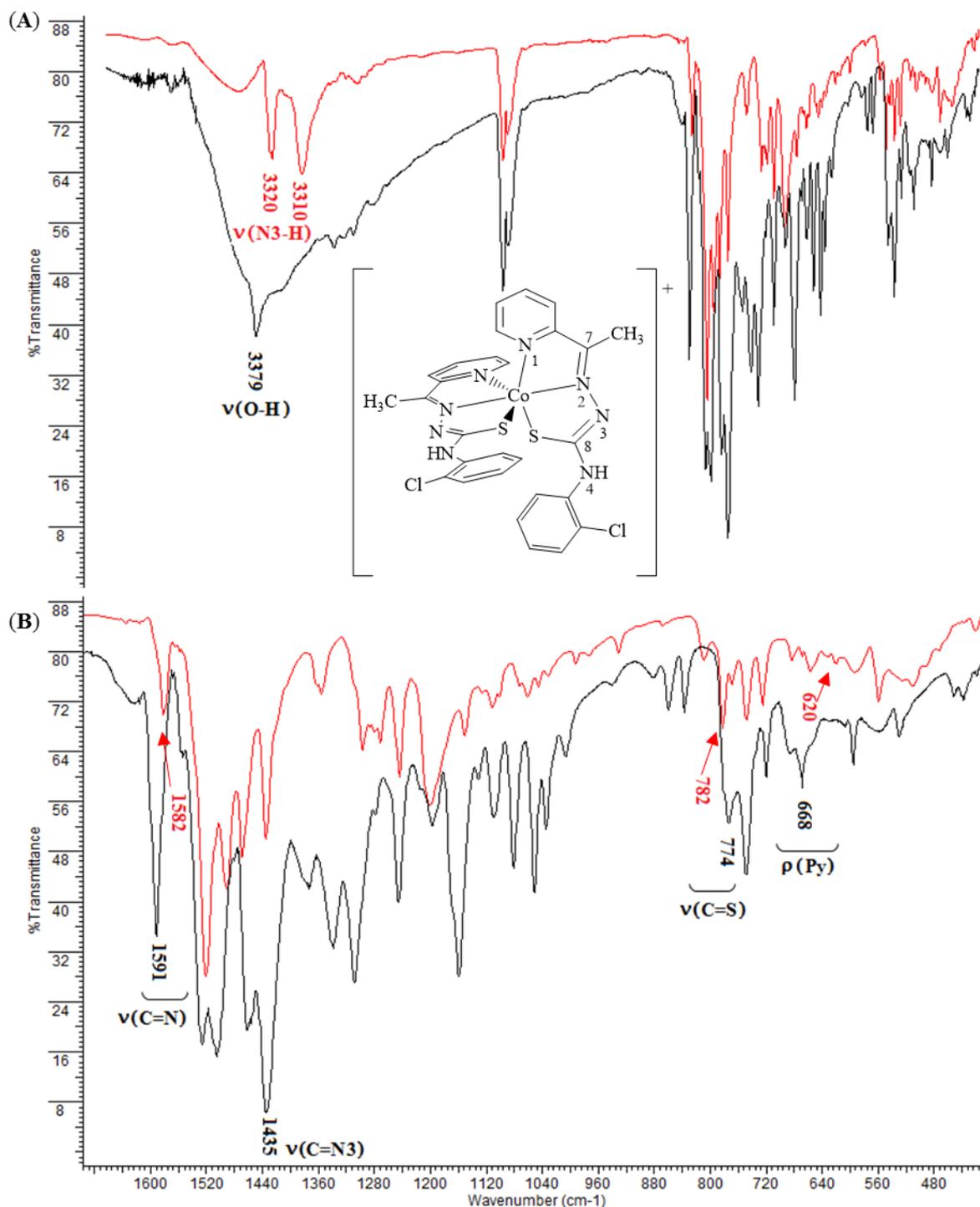


Figura 4.9 Espectros de absorção da região do infravermelho do complexo (9) e da tiossemicarbazona $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{oClPh}$ (vermelho), obtidos em pastilha de KBr. Região de $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ (A) e região expandida ($1700 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$) (B).

4.1.2.4 Cristalografia de raios X

Monocristais do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (**8a**) adequados para a difração de raios X foram obtidos após a recristalização do composto em solução metanólica a temperatura ambiente.

Medidas de difração de raios X do cristal foram realizadas em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI (Simon Fraser University, Burnaby, Canada) com fonte de grafite Mo $K\alpha$ ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) a 293 K. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas pelo método de mínimos quadrados F^2 utilizando programas ShelXle.²² Gráficos das estruturas moleculares foram obtidos utilizando o programa ORTEP.

O complexo (**8a**) cristalizou-se no sistema monoclinico (grupo espacial $P2_1/n$) com uma molécula $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}$ por unidade assimétrica. A unidade assimétrica do cristal contém também uma molécula de metanol como solvente de cristalização. A estrutura cristalina do complexo (**8a**) está apresentada na Figura 4.10. Na Tabela 4.10 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina do complexo (**8a**), bem como da tiossemicarbazona H2Ac4pClPh previamente descrita na literatura.¹⁷ Os valores de comprimentos e ângulos de ligação (Tabela 4.11) são similares aos valores encontrados para o complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (**7a**).¹³

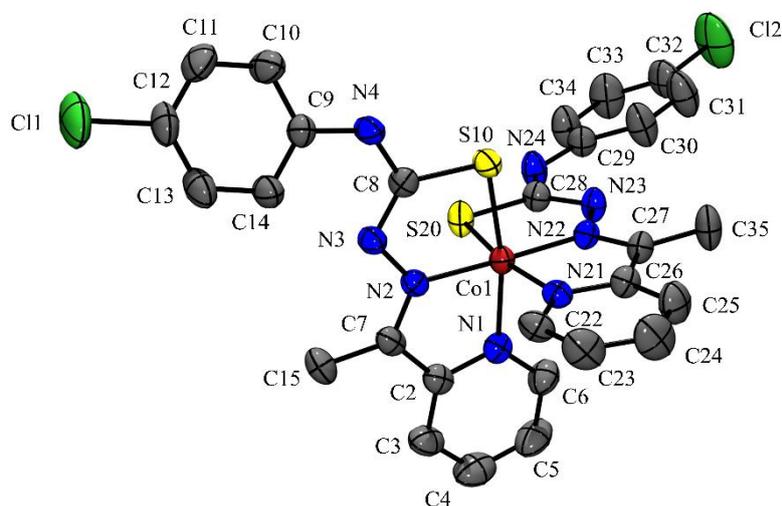


Figura 4.10 Diagrama ORTEP do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (**8a**). O solvente de cristalização e o contra-íon foram omitidos.

²² C.B. Hubschle, G.M. Sheldrick, B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.* 44 (2011) 1281-1284.

Tabela 4.10 Resumo da coleção de dados cristalográficos e resultados dos refinamentos das estruturas cristalográficas da tiossemicarbazona H2Ac4pClPh¹⁷ e do complexo [Co(2Ac4pClPh)₂]Cl·CH₃OH (**8a**)

	H2Ac4pClPh ¹⁷	8a
Fórmula empírica	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₄ S	C ₂₉ H ₂₈ N ₈ S ₂ Cl ₃ OCo
Massa molecular (g mol ⁻¹)	304,79	733,99
Temperatura (K)	---	293
Comprimento de onda (Å)	0,71073	1,54178
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /n	monoclínico, P2 ₁ /n
Parâmetros da célula unitária		
a (Å)	10,3223(5)	9,8288(2)
b (Å)	5,7130(3)	25,1779(4)
c (Å)	25,5526(13)	13,2495(2)
α (°)	90	90
β (°)	93,684(5)	99,124(1)
γ (°)	90	90
V (Å ³) / Z	1503,76(13) / 4	3237,4(10) / 4
Densidade calculada (mg m ⁻³)	1,346	1,506
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,388	0,80
F(000)	632	1504
Intervalo de θ (°)	3,01 – 26,37	3,5 – 68,6
Faixa de índices de Miller		
	-10 < h < 12	-11 ≤ h ≤ 11
	-7 < k < 7	-30 ≤ k ≤ 30
	-31 < l < 31	-15 ≤ l ≤ 15
Reflexões coletadas	6975	54007
Reflexões únicas (R _{int})	3055 (0,0405)	5951 (0,091)
Completeza	26,35° (99,9 %)	θ = 29,45° (99,7%)
Dados/restrições/parâmetros	3055/ 0/ 182	4507 / 0 / 411
S	0,781	1,02
Índices de R final [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0371; wR ₂ = 0,0625	R ₁ = 0,0410; wR ₂ = 0,0897
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,1001; wR ₂ = 0,0707	R ₁ = 0,0628; wR ₂ = 0,1002
Δρ _{máx} e Δρ _{mín} (e Å ⁻³)	0,168 e -0,183	0,36 e -0,40

Na estrutura apresentada na Figura 4.10 podemos observar que a tiossemicarbazona H2Ac4pClPh adota uma configuração *E* em relação à ligação C(7)=N(2) e se coordena de maneira aniônica através dos átomos de nitrogênio piridínico [N(1) e N(21)], nitrogênio imínico [N(2) e N(22)] e enxofre [S(10) e S(20)], formando um complexo de geometria octaédrica distorcida. O ângulo da ligação N(1)–Co–S(10) é igual a 162,74(8)°.

Comparando-se as distâncias de ligação do complexo (**8a**) com a tiossemicarbazona H2Ac4pClPh (Tabela 4.11), podemos verificar o alongamento das ligações C(7)–N(2),

N(2)–N(3) e C(8)–S(10), as quais passam de 1,283(2), 1,374(2) e 1,671(2) Å (H2AcPh) para 1,300(4), 1,380(3) e 1,739(2) Å [complexo (**8a**)], e o encurtamento da ligação N(3)–S(8) de 1,352(2) (H2AcPh) para 1,309(4) Å [complexo (**8a**)]. Estas variações concordam com a desprotonação de N(3)–H e formação de um sistema altamente deslocalizado, onde N(3)–C(8) adquire um caráter de dupla ligação e C(8)–S(10) muda de tiona (C=S) para tiolato (C-S). A distância de ligação entre o átomo de cobalto e o átomo de nitrogênio imínico N(2) [1,882(2) Å] é menor do que a distância de ligação entre o átomo de cobalto e o átomo de nitrogênio piridínico [1,950(2) Å].

Tabela 4.11 Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação da tiossemicarbazona H2Ac4*p*ClPh¹⁷ e do complexo [Co(2Ac4*p*ClPh)₂]Cl·CH₃OH (**8a**). Desvio padrão entre parênteses

Átomos	H2Ac4 <i>p</i> ClPh ¹⁷	8a
C(7)–N(2)/C(27)–N(22)	1,283(2)	1,300(4)/1,303(4)
N(2)–N(3)/N(22)–N(23)	1,374(2)	1,380(3)/1,377(3)
N(3)–C(8)/N(23)–C(28)	1,352(2)	1,309(4)/1,322(4)
N(4)–C(8)/N(24)–C(28)	1,341(2)	1,355(4)/1,358(4)
C(8)–S(10)/C(28)–S(20)	1,671(2)	1,739(3)/1,737(3)
N(1)–C(2)/N(21)–C(22)	---	1,355(4)/1,359(4)
C(2)–C(7)/C(22)–C(27)	1,484(2)	1,463(4)/1,459(4)
Co(1)–N(1)/Co(1)–N(21)	---	1,950(2)/1,962(3)
Co(1)–N(2)/Co(1)–N(22)	---	1,882(2)/1,883(2)
Co(1)–S(10)/Co(1)–S(20)	---	2,2104(9)/2,2102(10)
C(2)–C(7)–N(2)/C(22)–C(27)–N(22)	---	113,0(3)/113,3(3)
C(7)–N(2)–N(3)/C(27)–N(22)–N(23)	118,86(15)	118,7(2)/119,2(2)
N(2)–N(3)–C(8)/N(22)–N(23)–C(28)	118,66(15)	111,1(2)/111,4(2)
N(3)–C(8)–S(10)/N(23)–C(28)–S(20)	119,99(15)	125,1(2)/124,6(2)
N(1)–Co(1)–N(21)	---	90,93(10)
N(1)–Co(1)–N(22)	---	98,14(10)
N(1)–Co(1)–S(10)/N(21)–Co(1)–S(20)	---	168,74(8)/169,03(8)
N(2)–Co(1)–S(20)	---	91,53(8)
S(10)–Co(1)–S(20)	---	91,49(4)
S(10)–Co(1)–N(21)	---	90,00(7)
S(10)–Co(1)–N(22)	---	93,10(8)

Comparando-se os complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas, observa-se que as variações de comprimentos de ligações estão de acordo com a desprotonação do átomo de nitrogênio N(3) e coordenação ao metal [Tabelas 4.5 (pag. 79) e 4.11]. Além disso, como era esperado, os comprimentos das ligações Co-N(1) [1,918(18)], Co-N(2) [1,854(16)] e Co-O(10) [1,900(15) Å] no complexo (**4a**) são significativamente menores do que os comprimentos das ligações Co-N(1) [1,950(2)], Co-N(2) [1,882(2)] e Co-S(10) [2,2104(9) Å] no complexo (**8a**). A diferença no comprimento dessas ligações é coerente com o fato de o átomo de oxigênio ser mais eletronegativo que o átomo de enxofre.

4.2 Estudos eletroquímicos dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas

Em trabalhos anteriores relatados na literatura tem sido investigadas as propriedades redox de complexos de cobalto(III) com ligantes que possuem atividade antitumoral.²³⁻²⁷ Complexos de cobalto(III) têm sido utilizados para direcionar o ligante para o tumor sólido (região com baixa concentração de oxigênio) por meio da redução de Co(III) (inerte) para Co(II) (lábil) e consequente liberação do ligante ativo.^{17,28}

Medidas eletroquímicas foram realizadas a 25 °C utilizando-se soluções dos complexos (**4-11**) em acetonitrila (5×10^{-4} M) contendo o eletrólito suporte perclorato de tetrabutilamônio ([NBu₄][ClO₄], 0,1 M). Os complexos (**4-5** e **7-9**) apresentam pares de picos anódicos e catódicos bem definidos. Já os complexos contendo o grupo nitro (**6**, **10** e **11**) apresentaram um processo de oxi-redução mais complicado e serão discutidos posteriormente.

Na Figura 4.11 estão apresentados os voltamogramas cíclicos do complexo (**8**) a 100 mV s⁻¹ de -1,8 a 1,8 V e região expandida de -1,8 a -0,2 V. De um modo geral, os complexos (**4-5** e **7-9**) apresentam dois processos quasi-reversíveis atribuídos aos pares redox Co^{III}/Co^{II} (picos I e I') e Co^{II}/Co^I (picos II e II') e um processo irreversível em torno de 1,2 V (pico III') referente ao processo de oxidação envolvendo as hidrazonas^{29,30} [complexos (**4-5**)] ou

²³ T. W. Failes, C. Cullinane, C. I. Diakos, N. Yamamoto, J. G. Lyons, T. W. Hambley, *Chem. Eur. J.* 13 (2007) 2974.

²⁴ T. W. Failes, T. W. Hambley, *Dalton Trans* (2006) 1895.

²⁵ D. C. Ware, W. R. Wilson, W. A. Denny, C. E. F. Rickard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1991) 1171.

²⁶ E. T. Souza, L. C. Castro, F. A. V. Castro, L. C. Visentin, C. B. Pinheiro, M. D. Pereira, S. P. Machado, M. Scarpellini, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1355.

²⁷ D. C. Ware, P. J. Brothers, G. R. Clark, W. A. Denny, B. D. Palmer, W. R. Wilson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2000) 925.

²⁸ H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31.

²⁹ I.G. Belaya, S.V. Svidlov, A.V. Dolganov, G.E. Zelinskii, T.V. Potapova, A.V. Vologzhanina, O.A. Varzatskii, Y.N. Bubnov, Y.Z. Voloshin, *Dalton Trans.* 42 (2013) 13667.

³⁰ M. Bakir, O. Green, *J. Mol. Struct.* 996 (2011) 24.

tiossemicarbazonas^{13,31} [complexos (7-9)]. Os pares de picos I/I' e II/II' são representados pelas Equações 4.1 e 4.2, respectivamente, nas quais L representa os ligantes hidrazonas ou tiossemicarbazonas.

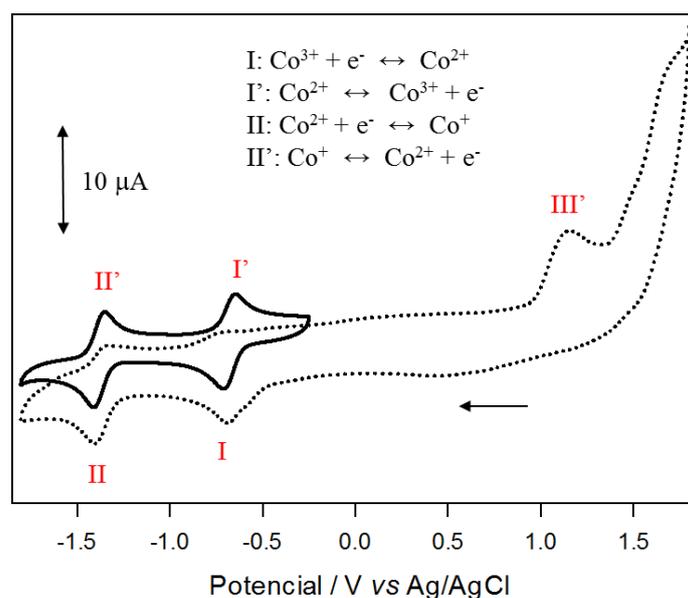


Figura 4.11 Voltamogramas cíclicos do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**) a 100 mV s^{-1} de -1,8 a 1,8 V (linha pontilhada) e região expandida de -1,8 a -0,2 V (negrito).

Na Tabela 4.12 estão apresentados os valores de potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), variações de potenciais entre picos catódicos e anódicos (ΔE_{p}) e os potenciais de meia onda [$E_{1/2} = (E_{\text{pc}} - E_{\text{pa}}) / 2$] *versus* Ag/AgCl para os pares redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ dos complexos (**4-5** e **7-9**). Os valores de potenciais de meia onda *versus* ENH foram obtidos utilizando o par redox Fc/Fc^+ (Fc = ferroceno) como padrão interno.

Valores $E_{1/2}$ na faixa de -1,24 a -1,41 V *versus* Ag/AgCl foram encontrados para $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$. O par redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ apresentou valores de potenciais $E_{1/2} = -0,24$ (**4**), $-0,19$ (**5**), $-0,72$ (**7**), $-0,68$ (**8**) e $-0,55$ V *versus* Ag/AgCl (**9**). Os valores de potenciais de redução do complexo (**7**) estão próximos aos valores reportados na literatura,¹³ $E_{1/2} = -1,46$ V e $E_{1/2} = -0,70$ V para os processos $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ e $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$, respectivamente.

³¹ M.V. Rodić, V.M. Leovac, L.S. Jovanović, L.S. Vojinović-Ješić, V. Divjaković, V.I. Češljević, *Polyhedron* 46 (2012) 124.

Tabela 4.12 Potenciais redox para os pares $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ dos complexos $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**), $[\text{Co}(\text{2Ac}p\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**5**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot \text{CH}_3\text{OH}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**7**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4p\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**8**) e $[\text{Co}(\text{2Ac}4o\text{ClPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (**9**) a 100 mV s^{-1}

Compostos	$\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$				$\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$			
	$E_{\text{pc}}(\text{I})^a$	$E_{\text{pa}}(\text{I}')^a$	$E_{1/2}^a$	$E_{1/2}^b$	$E_{\text{pc}}(\text{II})^a$	$E_{\text{pa}}(\text{II}')^a$	$E_{1/2}^a$	$E_{1/2}^b$
4	-0,27	-0,20	-0,24	-0,29	-1,40	-1,34	-1,37	-1,42
5	-0,22	-0,15	-0,19	-0,25	-1,37	-1,30	-1,34	-1,40
7	-0,75	-0,68	-0,72	-0,76	-1,44	-1,38	-1,41	-1,45
8	-0,71	-0,64	-0,68	-0,67	-1,41	-1,34	-1,38	-1,34
9	-0,58	-0,52	-0,55	-0,67	-1,26	-1,21	-1,24	-1,37

^a V vs Ag/AgCl

^b V vs ENH

Os valores de potenciais de redução dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas (-0,29 e -0,25 V) encontram-se na faixa de atuação de redutores celulares, entre -0,20 e -0,40 V *versus* ENH.³² Já os complexos com tiossemicarbazonas apresentaram valores mais negativos de potencial de redução, entre -0,67 e -0,76 V *versus* ENH. Valores semelhantes de $E_{1/2}$ foram determinados para outros complexos de cobalto(III) com atividade antitumoral.²⁶ Sendo assim, os estudos eletroquímicos sugerem que os complexos com hidrazonas (**4** e **5**) poderiam ser reduzidos mais facilmente do que os complexos com tiossemicarbazonas (**7-9**). Na Figura 4.12 estão apresentados os voltamogramas cíclicos dos complexos (**4-5** e **7-9**) na faixa de potencial de -1,8 a -0,2 V e velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} .

Ligantes σ -doadores possuem a capacidade de aumentar a densidade eletrônica sobre o metal tornando mais difícil o ganho de mais um elétron e causando um deslocamento do potencial de redução para valores mais negativos.^{33,34} Comparando-se os valores de $E_{1/2}$ na Tabela 4.12, podemos observar que a presença do substituinte cloro na posição *para* do anel fenílico dos complexos (**5** e **8**) provocou um pequeno deslocamento para região anódica (valores mais positivos de potencial) quando comparado aos complexos sem grupo substituinte no anel fenílico (**4** e **7**). O deslocamento foi mais pronunciado para o complexo (**9**) ($E_{1/2} = -0,67$ V) quando comparado ao complexo (**7**) ($E_{1/2} = -0,76$ V) (Figura 4.12). Este deslocamento era

³² D. C. Ware, B. D. Palmer, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1839.

³³ M. Scarpellini, J. C. Toledo Jr, A. Neves, J. Ellena, E. E. Castellano, D. W. Franco, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 707.

³⁴ E. T. Souza, L. C. Castro, F. A. V. Castro, L. C. Visentin, C. B. Pinheiro, M. D. Pereira, S. P. Machado, M. Scarpellini, *J. Inorg. Biochem* 103 (2009) 1355.

esperado uma vez que o átomo de cloro é um doador de elétrons mais fraco que o átomo de hidrogênio.³⁵

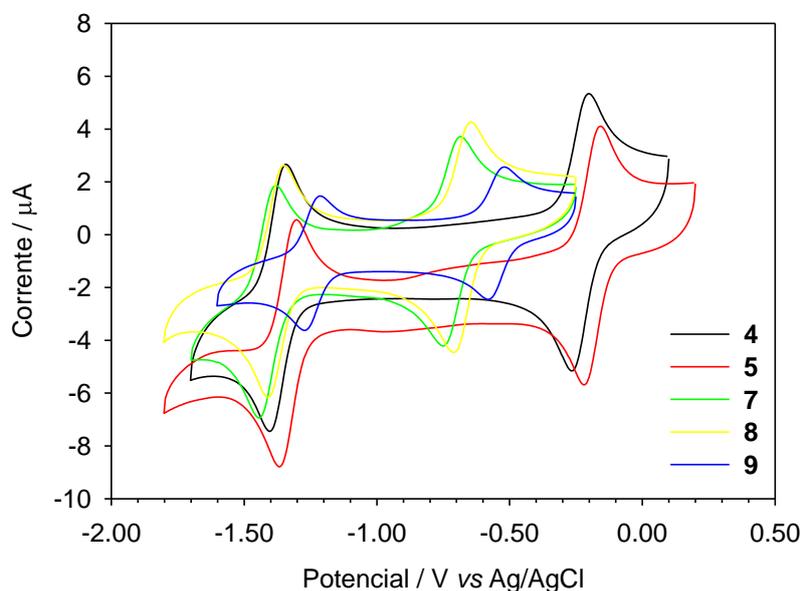


Figura 4.12 Voltamogramas cíclicos dos complexos $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4), $[\text{Co}(\text{2Ac}^o\text{CIPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (5), $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl}\cdot \text{CH}_3\text{OH}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (7), $[\text{Co}(\text{2Ac4}^o\text{CIPh})_2]\text{Cl}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (8) e $[\text{Co}(\text{2Ac4}^o\text{CIPh})_2]\text{Cl}\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ (9) a 100 mV s^{-1} .

Em um sistema reversível as varreduras na direção catódica e anódica originam o mesmo número de picos. Para os complexos em estudo foram observados dois picos catódicos e dois picos anódicos. No entanto, existem outros critérios que devem ser considerados ao definir o mecanismo do processo eletroquímico.^{36,37} Os critérios de reversibilidade são:

- a corrente de pico (i_p) varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($i_p \propto v^{1/2}$);
- a razão da corrente de pico anódico e catódico, i_{pa}/i_{pc} , deve ser igual ou próxima à unidade e independente da velocidade de varredura;
- a diferença entre os potenciais dos picos anódicos e catódicos ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) deve permanecer constante com a variação da velocidade de varredura. Na literatura determina-se que o valor de ΔE_p para um sistema reversível é igual a $59\text{ mV}/n$ (meio aquoso), sendo n o número de elétrons envolvidos no processo de redução.

³⁵ D. C. Ware, B. D. Palmer, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1839.

³⁶ A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2 ed. New York: Wiley, 2001.

³⁷ L. S. Andrade, R. C. Rocha-Filho, N. Bocchi, S. R. Biaggio, *Quim. Nova* 27 (2004) 866.

Voltamogramas cíclicos dos complexos (4-5 e 7-9) foram obtidos em diferentes velocidades de varredura ($v = 500, 200, 100, 75, 50$ e 25 mV s^{-1}) a fim de se estudar a reversibilidade dos processos redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$. Na Tabela 4.13 estão apresentados os valores de potenciais e correntes catódicas e anódicas e na Figura 4.13 estão apresentados os voltamogramas cíclicos do complexo (8) em diferentes velocidades de varredura. Observa-se que com a diminuição da velocidade de varredura ocorre uma proximidade entre os picos catódicos e anódicos e o sistema torna-se mais reversível.

Tabela 4.13 Potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa} / V vs. Ag/AgCl) e correntes de picos catódicos e anódicos (i_{pc} e i_{pa} / μA) para os pares redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (8) em diferentes velocidades de varredura (v / mV s^{-1})

v	$\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$						$\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$					
	E_{pc}	i_{pc}	E_{pa}	i_{pa}	ΔE_{p}	$i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}$	E_{pc}	i_{pc}	E_{pa}	i_{pa}	ΔE_{p}	$i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}$
25	-0,70	-2,25	-0,64	1,86	0,059	-0,83	-1,40	-2,37	-1,34	2,03	0,060	-0,86
50	-0,70	-2,76	-0,64	2,54	0,059	-0,92	-1,40	-3,18	-1,34	2,77	0,060	-0,87
75	-0,70	-3,49	-0,64	3,39	0,064	-0,97	-1,40	-3,89	-1,34	3,44	0,060	-0,88
100	-0,71	-3,75	-0,64	3,68	0,064	-0,98	-1,41	-4,18	-1,34	3,83	0,060	-0,92
200	-0,70	-5,10	-0,64	5,42	0,058	-1,06	-1,40	-6,61	-1,34	5,83	0,060	-0,88
500	-0,70	-8,81	-0,64	8,84	0,063	-1,00	-1,41	-10,9	-1,34	9,49	0,070	-0,87

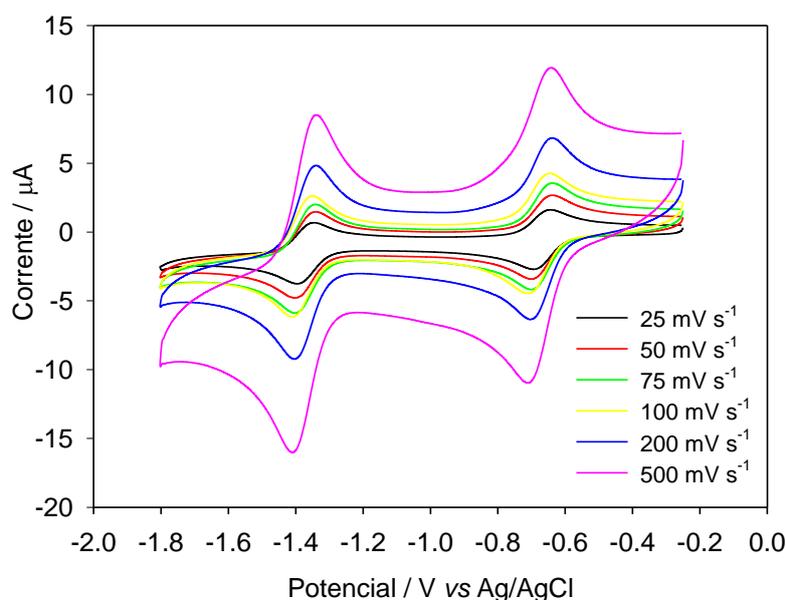


Figura 4.13 Voltamogramas cíclicos do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (8) a 25, 50, 75, 100, 200 e 500 mV s^{-1}

As curvas que relacionam a corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para os pares de picos $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ do complexo (8) estão apresentadas na Figura 4.14. Uma vez que a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o parâmetro de reversibilidade é satisfeito para ambos os pares redox. Por outro lado, a razão $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}$ é diferente da unidade e sofre variação com o aumento da velocidade de varredura (Tabela 4.13). Os valores de ΔE_p sofrem variação com o aumento da velocidade de varredura. Sendo assim, dado o não cumprimento de todos os parâmetros podemos afirmar que o sistema envolvendo os pares $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ é quasi-reversível.

O comportamento quasi-reversível dos complexos (4-6) e (7-9) indica uma redução seletiva para região de hipóxia, uma vez que os mesmos teriam a capacidade de se reoxidarem na presença células oxigenadas, garantindo a não-liberação do ligante fora da região do tumor.

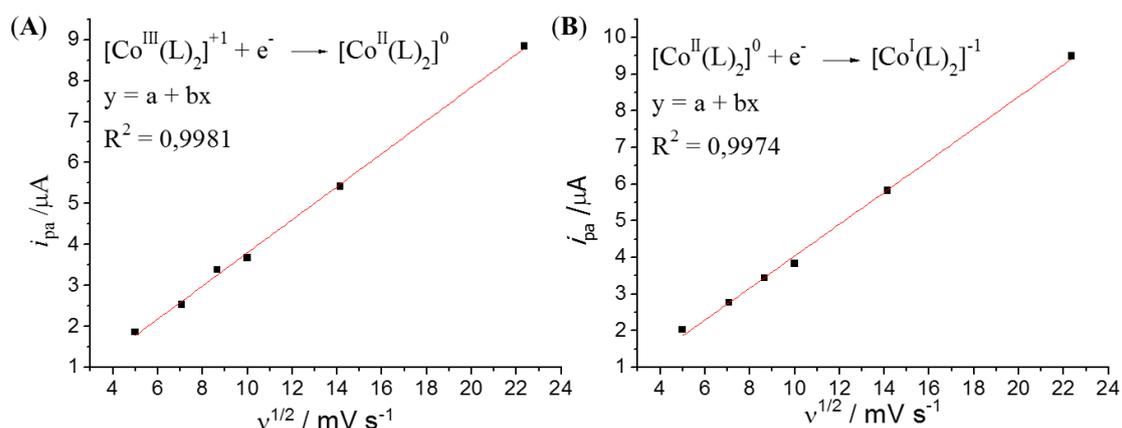


Figura 4.14 Plote linear da corrente de pico anódico (i_{pa}) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) para os pares de picos $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ (A) e $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ (B) do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4pClPh})_2]\text{Cl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (8).

Nos voltamogramas cíclicos dos complexos (6), (10) e (11) (Figura 4.15) foi observado um processo irreversível em torno de 1,10 V (pico III'), referente à oxidação dos ligantes $\text{H2Ac}p\text{NO}_2\text{Ph}$, $\text{H2Ac}4p\text{NO}_2\text{Ph}$ e $\text{H2Ac}o\text{NO}_2\text{Ph}$. Os valores de potencial E_p para os demais picos estão apresentados na Tabela 4.14.

Os voltamogramas dos complexos mostram dois processos de redução em torno de -0,98 a -1,18 V (pico IV) e -1,60 a -1,64 V (pico V) atribuídos à formação do radical $\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$.

e da espécie Ar–NHOH, respectivamente.^{38,39} Os potenciais de oxidação correspondentes foram observados em torno de -1,00 (pico IV') e -1,52 V (pico V').

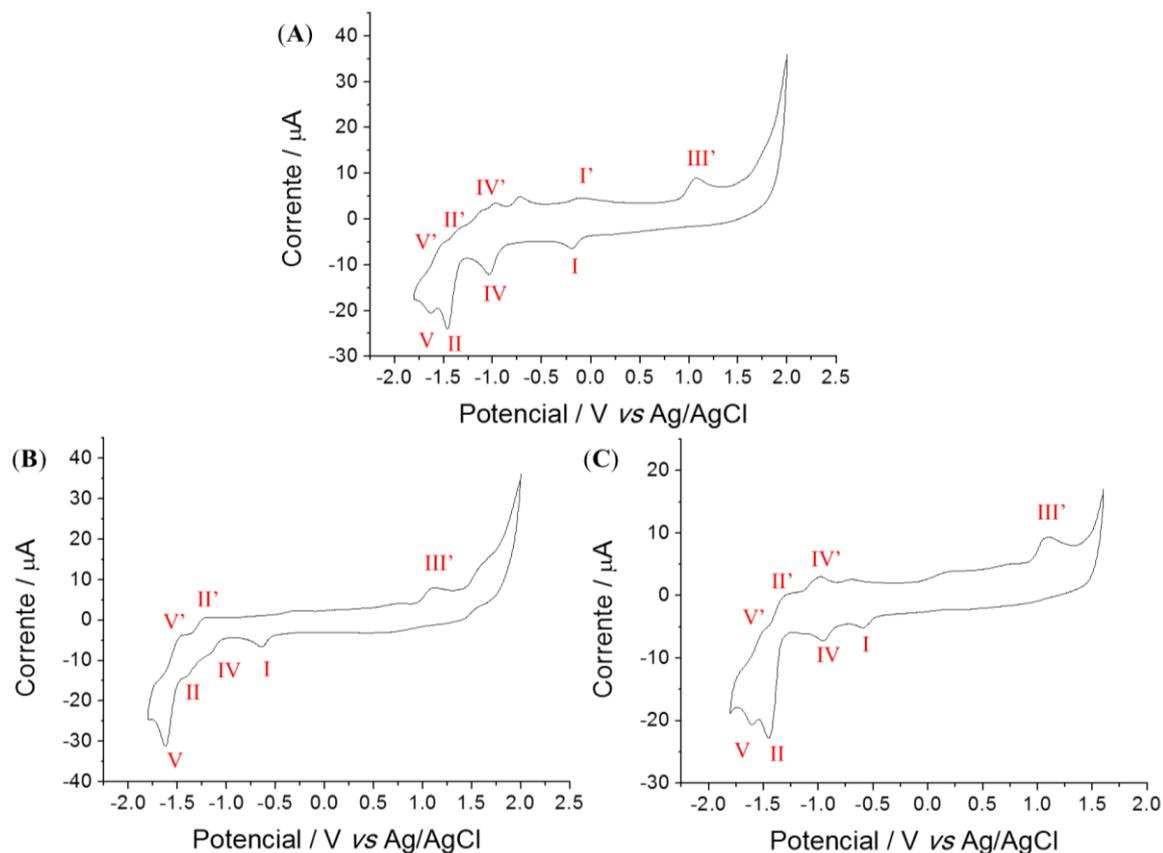


Figura 4.15 Voltamogramas cíclicos dos complexos: $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{pNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (**6**); $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{pNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) e $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**) a 100 mV s^{-1}

Tabela 4.14 Potenciais de picos catódicos e anódicos (E_{pc} e E_{pa} / V vs. Ag/AgCl) dos complexos $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{pNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (**6**), $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{pNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**10**) e $[\text{Co}(\text{2Ac}4\text{oNO}_2\text{Ph})_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**11**) a 100 mV s^{-1}

Compostos	E_{pc} (I)	E_{pa} (I')	E_{pc} (II)	E_{pa} (II')	E_{pa} (III')	E_{pc} (IV)	E_{pc} (IV')	E_{pc} (V)	E_{pa} (V')
6	-0,20	-0,14	-1,46	-1,32	1,07	-1,05	-0,97	-1,62	-1,52
10	-0,64	---	-1,40	---	1,10	-1,18	---	-1,64	---
11	-0,60	---	-1,46	-1,29	1,09	-0,96	-0,98	-1,60	-1,52

Para o processo redox $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ do complexo (**6**) foram encontrados $E_{\text{pc}} = -0,20$ (pico I) e $E_{\text{pa}} = -0,14$ V (pico I'). Para os complexos (**10**) e (**11**) foram atribuídos picos catódicos a -

³⁸ C. Rodrigues, A. A. Batista, R. Q. Aucélio, L. R. Teixeira, L. C. Visentin, H. Beraldo, *Polyhedron* 27 (2008) 3061.

³⁹ A. Pérez-Rebolledo, L. R. Teixeira, A. A. Batista, A. S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, P. Hernández, A. M. Ferreira, N. L. Speziali, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem* 43 (2008) 939.

0,64 e -0,60 V, respectivamente. Para o processo redox $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$, picos catódicos (II) foram encontrados em torno de -1,40 a -1,46 V e os anódicos (II') em torno de -1,29 a -1,36 V. Os processos redox envolvendo os grupos nitro-aromáticos dificultou a interpretação dos voltamogramas e determinação dos potenciais de picos anódicos envolvendo o centro metálico.

Da mesma maneira que a presença de substituinte doador de elétrons desloca o potencial para valores negativos, o processo inverso ocorre na presença de substituintes retiradores de elétrons tal como o grupo nitro. Comparando-se complexos de cobalto (III) com os ligantes [(2-hidroxibenzil)(2-(piridil-2-il)etil)imina (HL3) e [(2-hidroxi-5-nitrobenzil)(2-(piridil-2-il)etil)imina (HL4) foi observado um deslocamento de 0,39 V para região de maior potencial devido a presença do grupo nitro no complexo com o ligante HL3.⁴⁰ Comparando-se os valores de potenciais de redução das Tabelas 4.12 (pag. 96) e 4.14 podemos observar o deslocamento dos picos catódicos dos complexos (4) [$E_{\text{pc}}(\text{I}) = -0,27 \text{ V}$] e (7) [$E_{\text{pc}}(\text{I}) = -0,75 \text{ V}$] para região de maior potencial devido a presença do substituinte nitro nos complexos (6) [$E_{\text{pc}}(\text{I}) = -0,20 \text{ V}$], (10) [$E_{\text{pc}}(\text{I}) = -0,64 \text{ V}$] e (11) [$E_{\text{pc}}(\text{I}) = -0,60 \text{ V}$].

4.3 Estudos de interação dos complexos $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4) e $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl}\cdot \text{CH}_3\text{OH}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (7) com o agente redutor ditionito de sódio (DTN)

Espectros eletrônicos dos complexos (4) e (7) ($2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ em tampão Tris-HCl 5% DMSO) foram obtidos na ausência e presença do redutor ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Os espectros dos ligantes H2AcPh e H2Ac4Ph também foram obtidos nas mesmas condições experimentais.

Na ausência do agente redutor, foi observada uma banda de transição intraligante a 282 nm e duas bandas de transferência de carga (LMCT) a 372 e 387 nm no espectro eletrônico do complexo (4). O espectro eletrônico do complexo (7) apresentou uma banda de transição intraligante a 254 nm e uma banda LMCT a 372 nm, como mostrado na Figura 4.16.

Espectros eletrônicos do complexo (4) na presença de 3 equivalentes molares de DTN foram obtidos em função do tempo. Na Figura 4.16 A estão apresentados os espectros eletrônicos obtidos nos tempos $t = 0$, $t = 1$ e $t = 5 \text{ h}$. Uma diminuição da banda LMCT foi observada, sugerindo redução com possível liberação do ligante H2AcPh. O espectro do complexo (4) foi obtido também na presença de 10 equivalentes molares de DTN e a redução imediata do mesmo foi observada. Já para o complexo (7), não ocorreu diminuição de

⁴⁰ E. T. Souza, P. J. S. Maia, E. M. Azevedo, C. R. Kaiser, J. A. L. C. Resende, C. B. Pinheiro, T. A. Heinrich, R. S. da Silva, M. Scarpellini, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1767.

intensidade da banda de transição LMCT mesmo após 24 h na presença de 10 equivalentes molares de DTN (Figura 4.16 B). A banda de absorção intensa a 315 nm é referente ao DTN.

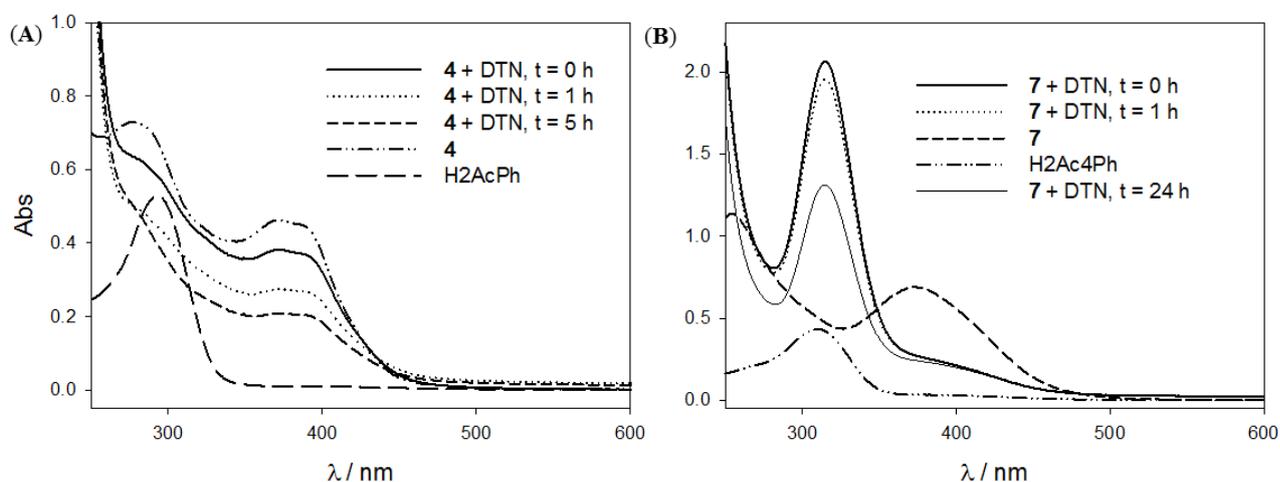


Figura 4.16 Espectros eletrônicos: complexo $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**4**) na presença de 3 equivalentes molares de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (DTN) (**A**) e complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})_2]\text{Cl}\cdot \text{CH}_3\text{OH}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**7**) na presença de 10 equivalentes molares de DTN (**B**). Os espectros eletrônicos dos complexos (**4**) e (**7**) e dos ligantes livres (H_2AcPh e $\text{H}_2\text{Ac4Ph}$) na ausência de DTN também foram obtidos nas mesmas condições experimentais.

A possível liberação do ligante H_2AcPh após redução do complexo (**4**) com DTN foi investigada por espectrometria de massas. Os espectros do ligante H_2AcPh , e do complexo (**4**) na ausência e presença de 3 equivalentes molares de DTN ($t = 10$ e $t = 60$ min) estão apresentados nas Figuras 4.17 A, B, C e D, respectivamente.

No espectro do ligante livre foi observado um pico m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 262$. No espectro do complexo (**4**) na ausência de DTN observou-se um pico m/z $[\text{M}]^+ = 535$. Na presença de 3 equivalentes molares de DTN foram observados os picos $[\text{M}]^+ 535$ e m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ 262$, indicando que o complexo (**4**) pode ser reduzido pelo DTN com subsequente liberação do ligante. Após 60 min de interação, o pico m/z $[\text{M}]^+ = 535$ ainda é observado, sugerindo que a descomplexação não foi completa. O mesmo efeito foi observado na presença de 10 equivalentes molares de DTN e se deve provavelmente à decomposição do redutor em solução em função do tempo.

Os estudos de redução com ditionito de sódio estão de acordo com os dados eletroquímicos, que mostraram que os complexos de cobalto(III) com hidrazonas são mais facilmente reduzidos do que os complexos com tiosemicarbazonas.

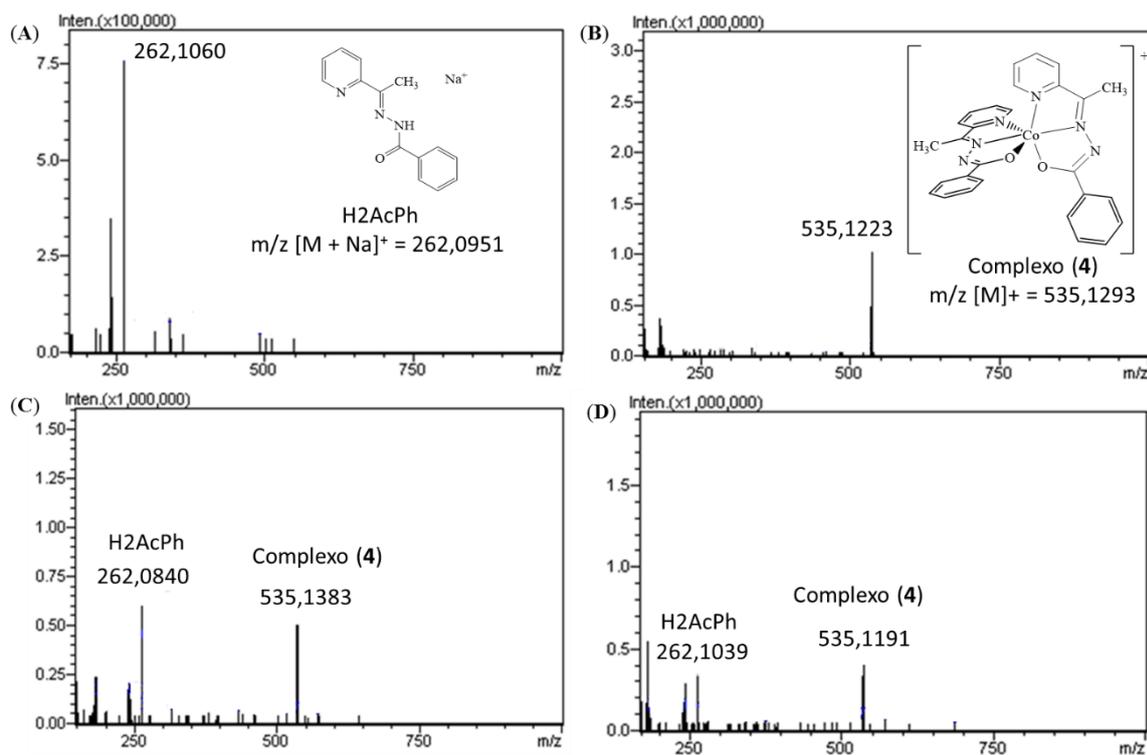


Figura 4.17 Espectros de massas: ligante H2AcPh (A) e complexo (4) na ausência de DTN (B), complexo (4) na presença de 3 equivalentes molares de DTN, t = 10 min (C) e t = 60 min (D). C = 25 μ M em tampão Tris-HCl 5 % DMSO, pH = 7,2.

4.4 Complexos de cobalto(III) contendo o ligante auxiliar tetradentado *tris*(metilpiridil)amina (TPA)

Complexos de cobalto(III) contendo ligantes com atividade citotóxica e o ligante auxiliar *tris*(metilpiridil)amina (TPA) como carreador tem sido investigado na literatura.^{24,41,42} TPA é um ligante tripodal que possui a vantagem de se ligar ao centro metálico de maneira tetradentada, permitindo que os sítios em posição *cis* fiquem disponíveis para coordenação a um ligante bidentado, formando um complexo de geometria octaédrica.⁴³

Os estudos eletroquímicos realizados neste trabalho mostraram que os complexos de cobalto(III) com hidrazonas possuem potencial de redução $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ na faixa de -0,24 a -0,19 e os complexos com tiossemicarbazonas na faixa -0,72 a -0,55 V *versus* Ag/AgCl. Estudos de redução mostraram que o complexo com a hidrazona H2AcPh [complexo (4)] pode ser reduzido por $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ com subsequente liberação do agente ativo.

⁴¹ A.K. Renfrew, N. S. Bryce, T. Hambley, *Chem Eur. J.* 21 (2015) 15224.

⁴² P. D. Bonnitcho, B. J. Kim, R. K. Hocking, J. K. Clegg, P. Turner, S. M. Neville, T. W. Hambley, *Dalton Trans.* 41 (2012) 11293.

⁴³ T. W. Failes, *Acta Cryst.* E59 (2003) m616.

Com o objetivo de avaliar a influência de ligantes auxiliares (ou co-ligantes) no comportamento eletroquímico dos complexos de cobalto(III) e a habilidade dos mesmos em liberar o ligante citotóxico, o complexo $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ foi sintetizado⁴⁴ e o mesmo reagiu com hidrazonas ou tiossemicarbazonas, na tentativa de se obter o complexo $[\text{Co}(\text{L})(\text{TPA})](\text{ClO}_4)_2$ (HL = H2AcPh ou H2Ac4Ph), como mostrado na Figura 4.18 para o ligante H2Ac4Ph.

Partimos da suposição de que o modo de coordenação bidentada dos ligantes no complexo $[\text{Co}(\text{L})(\text{tpa})](\text{ClO}_4)_2$, ao invés da coordenação tridentada dos complexos $[\text{Co}(\text{L})_2]\text{Cl}$, facilitaria a liberação do agente citotóxico após a redução do íon metálico. No entanto, a caracterização dos produtos (microanálises, espectros de infravermelho e RMN de ^1H) revelaram a presença do complexo $[\text{Co}(\text{L})_2]\text{ClO}_4$ (Figura 4.18). A obtenção de $[\text{Co}(\text{2AcPh})_2]\text{ClO}_4$ foi confirmada por difração de raios X (seção 4.1.1.4, pag. 76).

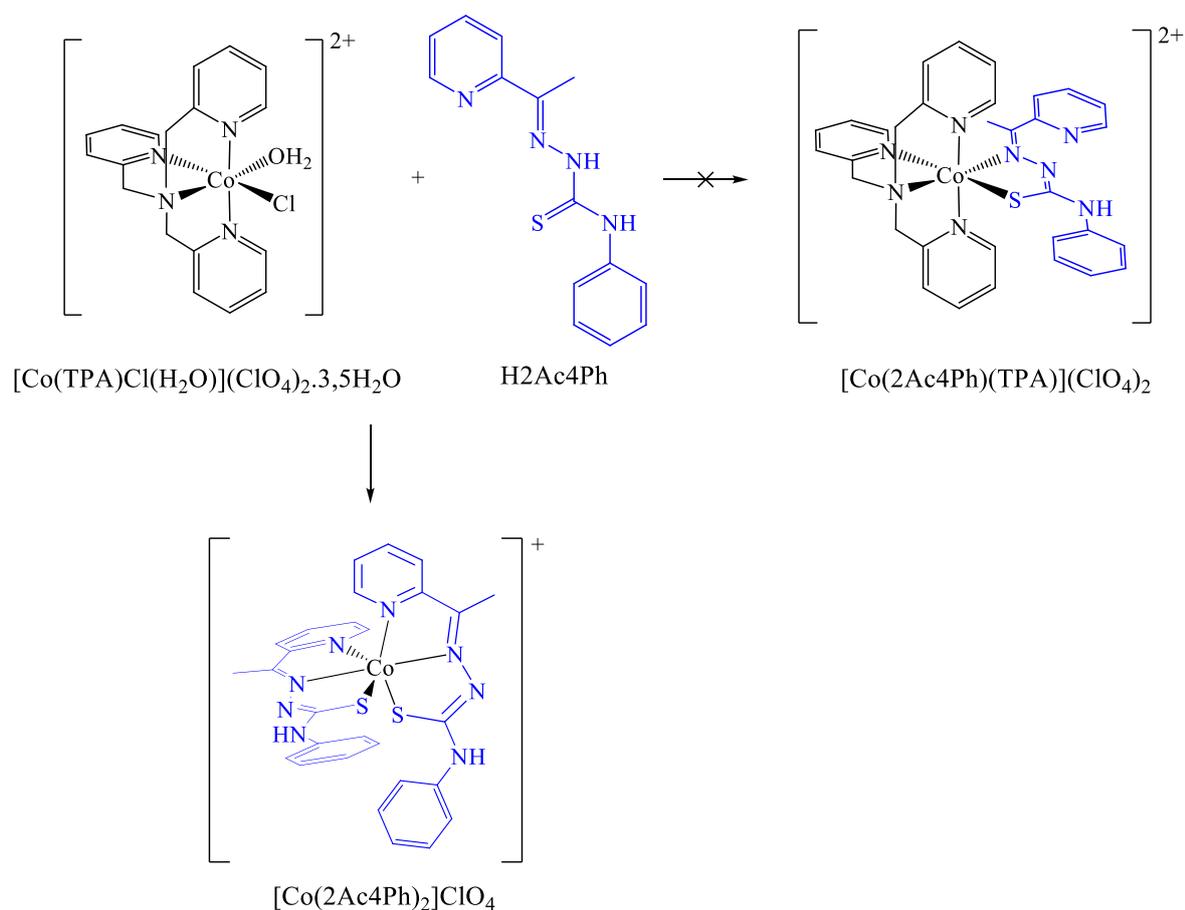


Figura 4.18 Esquema de síntese do complexo $[\text{Co}(\text{2Ac4Ph})(\text{TPA})](\text{ClO}_4)_2$

⁴⁴ J. B. Mandel, C. Maricondi, B. E. Douglas, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 2990.

4.5 Avaliação da atividade biológica das hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de cobalto(III)

4.5.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos complexos foi avaliada contra bactérias *Gram*-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12220) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Gram*-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), conforme procedimento descrito na seção 2.3.3.1 (pag. 35). Na Tabela 4.15 estão apresentados os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos, das hidrazonas e tiossemicarbazonas livres, e dos fármacos controle (ciprofloxacina e cloridrato de tetraciclina). Além disso, foram utilizados como controles o sal de partida $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e o sal de cobalto(III), $[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3$.

A atividade das hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina já haviam sido testadas frente bactérias *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e contra fungos *Candida albicans*. Os resultados mostraram que essas hidrazonas são inativas ou fracamente ativas.^{3,45}

Os valores de CIM apresentados na Tabela 4.15 revelam que bactérias *Gram*-positivas (*E. faecalis*, *S. epidermidis* e *S. aureus*) são mais sensíveis aos compostos testados do que bactérias *Gram*-negativas (*P. aeruginosa*). Este resultado era esperado uma vez que bactérias *Gram*-negativas possuem uma parede celular mais complexa e mais difícil de ser atravessada por agentes anitibacterianos.⁴⁶

De um modo geral, os complexos com hidrazonas não apresentaram atividade significativa contra *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, exceto para o complexo (6) que mostrou uma melhora da atividade em relação a hidrazona livre. O valor de CIM do complexo (6) contra as bactérias *E. faecalis* e *S. epidermidis* foi de 88,53 μM sendo que, para a hidrazona precursora foram encontrados valores maiores que 659,6 e 1758,9 μM , respectivamente.

Por outro lado, os complexos (4-6) mostraram-se ativos contra *S. aureus* com valores de CIM em torno de 0,92 - 17,15 μM . No caso do complexo (5) o valor de CIM (0,92 μM) é da ordem de grandeza do fármaco cloridrato de tetraciclina (0,15 μM). Os valores encontrados para as hidrazonas precursoras foram em torno de 76,13 – 439,7 μM . Estes resultados indicam que a coordenação ao cobalto resultou na melhora da atividade desses compostos.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.15 podemos concluir que os complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas foram mais ativos do que aqueles com

⁴⁵A. A. R. Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron* 38 (2012) 285.

⁴⁶D. O. Guimarães, L. S. Momesso, M. T. Pupo, *Quim. Nova* 33 (2010) 667.

hidrazonas. Além disso, observa-se que bactérias *S. aureus* são mais sensíveis aos compostos testados do que *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Todos os complexos com tiossemicarbazonas (**7-11**) foram ativos contra *S. aureus* e inativos contra *P. aeruginosa*. O complexo (**10**) foi ativo apenas contra *S. aureus* e apresentou menor atividade (CIM = 3,59 μ M) em relação aos demais complexos (0,37 – 0,45 μ M). Além disso, os testes realizados contra *E. faecalis* e *P. aeruginosa* mostraram uma diminuição da atividade da tiossemicarbazona H2Ac4pNO₂Ph após a complexação.

Tabela 4.15 CIM / μ M das hidrazonas e tiossemicarbazonas, seus complexos de cobalto(III), os sais CoCl₂·6H₂O e [Co(en)₃]Cl₃, ciprofloxacina e cloridrato de tetraciclina contra *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Compostos	Gram +			Gram -
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
H2AcPh	> 783,6	> 2090	130,6	> 522,4
[Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4)	> 411,9	> 823,8	17,15	> 206,0
H2AcpClPh	> 685,0	> 456,7	76,13	> 456,7
[Co(2AcpClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5)	> 355,7	> 711,4	0,92	> 177,8
H2AcpNO ₂ Ph	> 659,6	> 1758,9	> 439,7	> 439,7
[Co(2AcpNO ₂ Ph) ₂]Cl·2,5H ₂ O (6)	88,53	88,53	14,76	> 177,1
H2Ac4Ph	> 462,4	> 462,4	> 462,4	> 462,4
Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7)	11,74	15,66	1,95	187,9
H2Ac4pClPh	102,5	205,05	> 410,1	> 410,1
[Co(2Ac4pClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8)	3,57	5,35	0,45	171,5
H2Ac4oClPh	> 164,0	> 164,0	41,01	41,01
[Co(2Ac4oClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9)	5,94	5,94	0,37	> 71,23
H2Ac4pNO ₂ Ph	> 396,4	> 396,4	> 396,4	> 396,4
[Co(2Ac4pNO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (10)	> 345,8	> 172,9	3,59	> 345,8
H2Ac4oNO ₂ Ph	> 396,4	> 396,4	14,41	> 396,4
[Co(2Ac4oNO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (11)	5,39	5,39	0,43	172,9
CoCl ₂ ·6H ₂ O	> 1051	> 2102	> 1051	> 1051
[Co(en) ₃]Cl ₃	> 723,4	> 1447	> 723,4	> 723,4
Ciprofloxacina	2,35	2,35	---	---
Cloridrato de tetraciclina	---	---	0,15	7,04

Os complexos com tiossemicarbazonas contendo substituintes em posição *orto* ou *para* (**8**, **9** e **11**) mostraram-se mais ativos do que o complexo contendo o ligante H2Ac4Ph. Além disso os valores de CIM obtidos para esses complexos (3,57 – 5,94 μM para *E. faecalis*, 5,35 – 5,39 μM para *S. epidermidis* e 0,37 – 0,45 μM para *S. aureus*) estão próximos aos valores obtidos para os fármacos ciprofloxacina (2,35 μM para *E. faecalis* e *S. epidermidis*) e cloridrato de tetraciclina (0,15 μM para *S. aureus*). Para os complexos (**7-9**) e (**11**) observou-se uma melhora significativa da atividade da tiossemicarbazona após a complexação frente a *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *S. aureus*.

A atividade dos complexos com hidrazonas contra fungos *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (isolado clínico 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitaniae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida tropicalis* (ATCC 750) foi estudada utilizando-se o método de microdiluição em placas de 96 poços. A maior concentração testada foi de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de CI_{50} dos complexos (**4-6**) estão apresentados na Tabela 4.16. Não foi possível a determinação do CI_{50} dos complexos com tiossemicarbazonas devido à baixa solubilidade dos mesmos nas condições do teste.

Observa-se na Tabela 4.16 que as hidrazonas com substituintes em posição *para* (H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph) foram mais ativas do que a hidrazona H2AcPh indicando que a presença de grupos retiradores de elétrons no grupo fenil poderia favorecer a atividade desses ligantes. A hidrazona H2AcpNO₂Ph mostrou-se mais ativa do que as demais hidrazonas frente a todos os fungos testados, sendo mais ativa (7,4 μM) do que o fármaco nistatina (12,6 μM) frente a *C. parapsilosis*. Em contrapartida, observa-se uma diminuição na atividade dessa hidrazona com a complexação ao cobalto(III) para todos os fungos testados.

A diminuição da atividade das hidrazonas H2AcpClPh e H2AcPh com a formação dos complexos (**4**) e (**5**) também foi observada frente a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Por outro lado, resultados interessantes foram obtidos para os complexos (**4**) e (**5**), que exibiram maior atividade quando comparados às hidrazonas livres frente a *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*. Os valores de CI_{50} do complexo (**5**) foram de 8,6 e 10,6 μM para *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*, respectivamente, sendo estes próximos aos valores encontrados para nistatina (5,6 μM para *C. lusitaniae* e 10,2 μM para *C. tropicalis*).

Sendo assim, pode-se dizer que a complexação ao íon cobalto(III) foi uma boa estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana tanto das hidrazonas quanto das tiossemicarbazonas frente aos microrganismos testados.

Tabela 4.16 CI_{50} / μM das hidrazonas, seus complexos de cobalto(III), os sais $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ e $[Co(en)_3]Cl_3$, nitrato de miconazol e nistatina contra as espécies de fungos do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*

Compostos	CI_{50} / μM					
	CA	CD	CG	CL	CP	CT
H2AcPh	212,5	98,1	441,5	182,2	81,2	522,4
$[Co(2AcPh)_2]Cl \cdot 2H_2O$ (4)	276,8	32,4	287,1	24,3	---	146,2
H2AcpClPh	113,3	23,0	103,0	65,9	38,3	129,5
$[Co(2AcpClPh)_2]Cl \cdot 3,5H_2O$ (5)	---	14,9	---	8,6	---	10,6
H2AcpNO ₂ Ph	52,5	18,6	101,7	22,1	7,4	90,2
$[Co(2AcpNO_2Ph)_2]Cl \cdot 2,5H_2O$ (6)	124,7	36,3	166,2	45,7	---	95,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	111,7	108,4	49,0	145,0	69,3	202,2
$[Co(en)_3]Cl_3$	723,4	---	650,8	378,6	20,7	242,7
Nitrato de miconazol	5,8	4,6	18,5	0,6	5,8	2,0
Nistatina	5,6	4,7	2,1	5,6	12,6	10,2
--- $CI_{50} > 250 \mu g mL^{-1}$						

4.5.2 Atividade citotóxica

Testes de atividade citotóxica dos complexos (4-11) foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares: HL60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia linfóide), THP-1 (leucemia monocítica), MCF-7 e MDA-MB-231 (carcinoma mamário), HCT-116 (carcinoma colorretal) e Vero (rim de macaco verde, usada como modelo de células não tumorais). Juntamente com os complexos foram testados também os ligantes livres, etoposídeo e cisplatina como fármacos controle, e os sais $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ e $[Co(en)_3]Cl_3$.

As células foram tratadas com os compostos numa faixa de 100 a 0.001 μM e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Os valores de CI_{50} (Tabela 4.17) são expressos como média \pm desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,5%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores de CI_{50} dos sais de cobalto e do complexo (10) não foram determinados pois esses compostos apresentaram porcentagem de inibição menor que 50 % a 10 μM (triagem). No caso dos complexos com hidrazonas serão apresentados os valores de porcentagens de inibição a 1 μM .

Em geral, as hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina apresentaram valores de CI_{50} da mesma ordem de grandeza do fármaco controle etoposídeo contra as células leucêmicas (HL60, Jurkat e THP-1). Os ligantes foram muito mais citotóxicos ($CI_{50} = 0,05$ a 10, 5 μM) do que o etoposídeo ($CI_{50} > 100 \mu M$) contra as células de tumores

sólidos (MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116). Na maioria dos casos esses ligantes mostraram-se menos citotóxicos frente às células sadias Vero.

Os complexos (**4-9** e **11**) foram menos ativos frente às células leucêmicas e mais ativos frente as células de tumores sólidos, quando comparados à cisplatina. Os complexos (**7**), (**8**) e (**10**) exibiram uma baixa citotoxicidade frente às células sadias.

As hidrazonas e tiossemicarbazonas se mostraram em geral mais ativas do que seus complexos de cobalto(III) contra as células HL60, Jurkat, THP-1 e Vero, com exceção do complexo (**8**) ($CI_{50} = 12,3 \mu\text{M}$) que apresentou uma atividade similar ao ligante H2Ac4pCIPh ($CI_{50} = 8,12 \mu\text{M}$) contra a célula Jurkat.

Considerando a proporção de dois ligantes para um íon metálico na estrutura dos complexos $[\text{Co}(\text{L})_2]^+$, **4-6** apresentaram valores de porcentagem de inibição similares [complexo (**4**) contra MDA-MB-231] ou menores em relação às hidrazonas livres contra as células de tumores sólidos. Uma diminuição da citotoxicidade das tiossemicarbazonas frente às células de tumores sólidos também foi observada após a complexação ao íon cobalto(III). Os melhores resultados foram observados para os complexos (**7**) e (**8**) que se mostraram consideravelmente menos ativos do que os ligantes H2Ac4Ph e H2Ac4pCIPh contra as células MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116. Além disso, esses compostos apresentaram valores de $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ contra células Vero. Esses resultados seriam interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de pró-drogas ativadas por hipóxia uma vez que o complexo pode funcionar como carreador do agente ativo. No entanto, como demonstramos, o potencial de redução dos complexos com as hidrazonas seria mais favorável do aquele dos complexos com tiossemicarbazonas.

Com o intuito de estudar a seletividade dos complexos para a região de hipóxia, estudos de citotoxicidade dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas (**4-5**) e tiossemicarbazonas (**7-8**) também foram realizados contra células de tumor mamário MCF-7 cultivadas no modelo tridimensional *soft-agar*. Tem sido proposto na literatura que o teste realizado com células cultivadas no modelo 3D é superior ao teste realizado em culturas de monocamada (modelo 2D), uma vez que o crescimento da célula em 3D é mais similar ao ambiente celular *in vivo*.^{47,48}

⁴⁷ S. N. Anderson, D. L. Towne, D.J. Burns, U. J. Warrior, *Biomol. Screen.* 12 (2007) 938.

⁴⁸ C. J. Doillon, E. Gagnon, R. Paradis, M. Koutsilieris, *Anticancer Res.* 24 (2004) 2169.

Tabela 4.17 Efeito citotóxico (CI₅₀ / μM ou % de inibição) das hidrazonas e tiossemicarbazonas, seus complexos de cobalto(III), etoposídeo e cisplatina contra linhagens celulares HL60, Jurkat, THP-1, Vero, MCF-7, MDA-MB231, MCF-7 e HCT-116

Compostos	HL60	Jurkat	THP-1	Vero	MCF-7	MDA-MB-231	HCT-116
H2AcPh	2,41 ± 0,69 (39,2 % a 1 μM)	10,06 ± 0,24 (28,6 % a 1 μM)	1,39 ± 0,70 (44,3 % a 1 μM)	7,10 ± 0,35 (33,5 % a 1 μM)	10,5 ± 3,45 (25,7 % a 1 μM)	6,04 ± 0,21 (10,4 % a 1 μM)	8,69 ± 2,99 (30,1 % a 1 μM)
[Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4)	20,8 % a 1 μM	7,80 % a 1 μM	0,33 % a 1 μM	4,9 % a 1 μM	26,4 % a 1 μM	20,3 % a 1 μM	22,4 % a 1 μM
H2Ac _p ClPh	0,42 ± 0,16 (65,1 % a 1 μM)	4,22 ± 0,18 (32,9 % a 1 μM)	2,55 ± 1,04 (44,9 % a 1 μM)	65,2 ± 9,61 (30,1 % a 1 μM)	4,92 ± 1,18 (51,5 % a 1 μM)	9,82 ± 2,59 (33,3 % a 1 μM)	1,45 ± 0,92 (51,9 % a 1 μM)
[Co(2Ac _p ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5)	39,1 % a 1 μM	17,9 % a 1 μM	16,4 % a 1 μM	21,3 % a 1 μM	0,81 ± 0,32 (50,8 % a 1 μM)	41,6 % a 1 μM	59,4 % a 1 μM
H2Ac _p NO ₂ Ph	0,53 ± 0,35 (75,7 % a 1 μM)	0,90 ± 0,65 (60,4 % a 1 μM)	1,15 ± 0,34 (52,7 % a 1 μM)	12,7 ± 8,77 (39,1 % a 1 μM)	4,00 ± 2,90 (44,5 % a 1 μM)	3,27 ± 2,85 (55,8 % a 1 μM)	1,39 ± 0,81 (55,6 % a 1 μM)
[Co(2Ac _p NO ₂ Ph) ₂]Cl·2,5H ₂ O (6)	5,57 ± 0,75 (23,9 % a 1 μM)	10,2 % a 1 μM	15,3 % a 1 μM	23,5 % a 1 μM	3,41 ± 0,02 (48,56 % a 1 μM)	4,21 ± 1,09 (39,10 % a 1 μM)	2,83 ± 0,23 (45,3 % a 1 μM)
H2Ac4Ph	0,17 ± 0,04	18,5 % a 10 μM	4,41 ± 2,41	6,06 ± 0,57	0,30 ± 0,18	5,63 ± 3,24	0,68 ± 0,36
Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7)	5,81 ± 2,59	ND	ND	> 100	> 100	17,4 ± 12,8	33,5 ± 11,0
H2Ac4 _p ClPh	0,24 ± 0,05	12,3 ± 10,8	37 % a 10 μM	3,65 ± 3,02	0,16 ± 0,03	0,53 ± 0,52	5,69 ± 2,87
[Co(2Ac4 _p ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8)	6,27 ± 3,00	8,12 ± 0,79	ND	> 100	11,9 ± 4,84	22,6 ± 23,62	17,7 ± 8,15
H2Ac4 _o ClPh	0,58 ± 0,07	0,69 ± 1,88	20 % a 10 μM	26,5 % a 10 μM	2,42 ± 0,03	0,05 ± 0,04	4,64 ± 0,04
[Co(2Ac4 _o ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9)	3,19 ± 2,90	4,51 ± 2,81	ND	8,19 ± 6,83	2,39 ± 1,91	3,50 ± 3,39	3,26 ± 2,06
H2Ac4 _p NO ₂ Ph	48,1 % a 1 μM	16,2 % a 1 μM	7,1 % a 1 μM	23,4 % a 1 μM	31,3 % a 1 μM	0,25 % a 1 μM	10,4 % a 1 μM
[Co(2Ac4 _p NO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (10)				ND			
H2Ac4 _o NO ₂ Ph	0,20 ± 0,08	3,16 ± 1,23	7,21 ± 3,10	6,63 ± 1,42	1,88 ± 1,28	3,88 ± 0,69	4,07 ± 2,32
[Co(2Ac4 _o NO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (11)	6,19 ± 2,74	6,29 ± 6,82	ND	22,7 ± 27,7	9,77 ± 5,16	6,52 ± 3,67	8,30 ± 2,74
Etoposídeo	0,86 ± 0,39	6,50 ± 1,06	2,75 ± 1,06	> 100	> 100	> 100	> 100
Cisplatina	0,023 ± 0,014	0,27 ± 0,09	0,015 ± 0,011	13,1 ± 0,63	> 100	> 100	> 100

* ND = não determinado (CI₅₀ não determinado para compostos que apresentaram porcentagem de inibição menor que 50 % a 10 μM)

Estudos de atividade citotóxica das hidrazonas H2Ac_pClPh e H2Ac_pNO₂Ph e seus complexos de bismuto(III) realizados frente às células HCT-116 e MCF-7 cultivadas em monocamada e *soft-agar* foram publicados recentemente.⁴⁹ Os resultados mostraram que os valores de CI₅₀ (0,41 – 0,88 μM) dos compostos contra às células HCT-116 cultivadas em *soft-agar* foram três vezes menores do que os valores de CI₅₀ (1,42 – 2,78 μM) dos compostos contra às células HCT-116 cultivadas em monocamada.

Os valores de porcentagem de viabilidade celular frente a célula MCF-7 cultivadas em *soft-agar* foram determinados para os ligantes H2AcPh, H2Ac_pClPh, H2Ac4Ph e H2Ac4_pClPh, seus complexos de cobalto(III), o sal CoCl₂·6H₂O e o fármaco controle cisplatina (Tabela 4.18). Todos os compostos foram testados a 1 μM. Os compostos foram testados novamente contra células MCF-7 cultivadas no modelo 2D para comparação dos resultados. Ao contrário do esperado, foi observado que os compostos apresentam maior atividade frente às células MCF-7 cultivadas no modelo 2D quando comparado ao modelo 3D. Apesar de a cultura celular em *soft-agar* ser mais similar ao ambiente celular *in vivo* tem sido relatado na literatura que o microambiente 3D facilita a geração de resistência frente a agentes citotóxicos.^{48,50,51}

Tabela 4.18 Comparação dos valores de % de viabilidade celular dos complexos de cobalto(III), ligantes livres, sal CoCl₂·6H₂O e cisplatina contra células MCF-7 cultivadas nos modelos monocamada (2D) e *soft-agar* (3D)

Compostos	% de Viabilidade Celular (1 μM)	
	2D	3D
H2AcPh	75,0 ± 11,0	97,1 ± 22,2
[Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4)	93,9 ± 9,21	121 ± 46,1
H2Ac _p ClPh	57,8 ± 0,35	63,8 ± 18,0
[Co(2Ac _p ClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5)	68,1 ± 3,37	89,2 ± 9,21
H2Ac4Ph	59,0 ± 4,87	60,0 ± 1,57
Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7)	90,1 ± 16,5	92,9 ± 17,3
H2Ac4 _p ClPh	75,0 ± 16,2	61,3 ± 21,0
[Co(2Ac4 _p ClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8)	104 ± 10,2	111 ± 31,2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	108 ± 4,39	141 ± 16,7
Cisplatina	97,7 ± 1,51	76,3 ± 4,54

⁴⁹ I. P. Ferreira, E. D. L. Piló, A. A Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, J. P. Ramos, L. B. Marques, P. H. D. Prazeres, J. A. Takahashi, E. M. Souza-Fagundes, W. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 2988.

⁵⁰ J. W. Kim, W. J. Ho, B. M. Wu, *Anticancer Res.* 31 (2011) 3237.

⁵¹ W. S. Dalton, *Drug. Resist. Updat* 2 (1999) 285.

4.5.3 Estudos de interação com albumina sérica humana (ASH)

A interação entre os complexos (4-9) e (11) e ASH foi estudada por meio de titulações espectrofluorimétricas. Esses estudos já haviam sido realizados para os complexos de rênio(I) (seção 3.2.3, pag. 64). Não foi possível avaliar a interação entre ASH e o complexo (10), pois o mesmo não é estável na solução 5% DMSO/tampão (5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl, pH = 7,4).

Os espectros de fluorescência da ASH na presença de várias concentrações do complexo (4) estão apresentados na Figura 4.19. O primeiro pico, com máximo de emissão em torno de 340 nm é referente à ASH na ausência do complexo e à medida que se aumenta a concentração do complexo (4) observa-se um efeito hipocrômico. A diminuição da intensidade de fluorescência sugere a interação do ASH com o agente supressor. Além disso, foi possível observar um deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção, indicando a diminuição da polaridade e o aumento da hidrofobicidade em torno do resíduo de triptofano 214 (Trp-214).^{52,53} Esses deslocamentos verticais e horizontais nos máximos de emissão do ASH também foram observados nos espectros obtidos para os complexos (5-9) e (11).

Os parâmetros obtidos a partir dos espectros de emissão do sistema [ASH-complexo de Co(III)] e das Equações 2.9 e 2.10 (pag. 40) estão apresentados na Tabela 4.19. Os cálculos foram realizados levando-se em consideração o efeito filtro uma vez que, na concentração testada, os complexos apresentam absorvância maior que 0,1 nos comprimentos de onda de excitação (295 nm) e emissão (340 nm). Na Figura 4.20 estão apresentados como exemplo os espectros de absorção obtidos a partir da solução de ASH titulada com o complexo (4).

Foram obtidos valores de K_S em torno de $1,89 - 3,82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, os quais correspondem à faixa de $0,70 - 1,41 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ obtida para K_q considerando $\tau_0 = 2,7 \text{ ns}$ para Trp-214. Este valor é maior do que o valor de K_q (aproximadamente $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) encontrado em processos dinâmicos, indicando a supressão de fluorescente *via* mecanismo estático, ou seja, formação de ligação entre o agente supressor e o fluoróforo.

⁵² N. Wang, L. Ye, B. Q. Zhao, J. X. Yu, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41 (2008) 589.

⁵³ F. J. Fard, Z. M. Khoshkhoo, H. Mirtabatabaei, M. R. Housaindokht, R. Jalal, H. E. Hosseini, M. R. Bozorgmehr, A. A. Esmaili, M. J. Khoshkholgh, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 74.

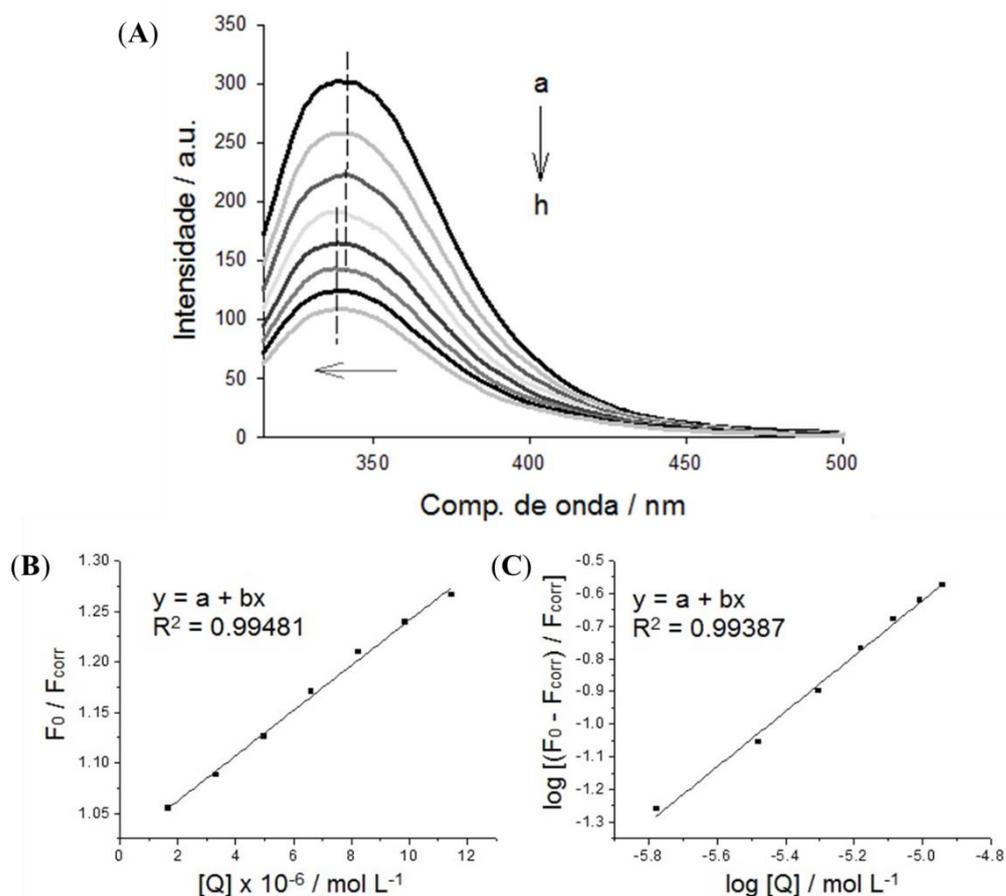


Figura 4.19 Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 295$ nm) do sistema ASH-**4** (tampão 5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl; pH = 7,4); (a) 2,0 μ M de ASH; (b-h) 2,0 μ M de ASH na presença de 1,67; 3,33; 4,98; 6,61; 8,24; 9,85 e 11,5 μ M de **4** (A). Condições experimentais: $\lambda_{exc} = 295$ nm e T= 25 °C. Gráficos de F_0/F_{corr} vs $[Q]$ (B) e $\log[(F_0 - F_{corr})/F_{corr}]$ vs $\log[Q]$ (C) para os dados de $\lambda_{em} = 340$ nm.

Tabela 4.19 Constante de supressão bimolecular (K_q), constante de associação do complexo (K_S), constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) para o sistema [ASH-complexos de Co(III)]

Compostos	K_S (10^4) $\text{mol}^{-1} \text{L}$	K_q (10^{13}) $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$	$\text{Log } K_b$ $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$	n
[Co(2AcPh) ₂]Cl·2H ₂ O (4)	2,23 ± 0,03	0,83 ± 0,18	3,61 ± 0,14	0,85 ± 0,03
[Co(2AcpClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (5)	3,40 ± 0,02	1,26 ± 0,08	4,83 ± 0,24	1,06 ± 0,05
[Co(2AcpNO ₂ Ph) ₂]Cl·2,5H ₂ O (6)	2,66 ± 0,07	0,99 ± 0,03	3,68 ± 0,17	0,85 ± 0,03
[Co(2Ac4Ph) ₂]Cl·CH ₃ OH·0,5H ₂ O (7)	1,89 ± 0,02	0,70 ± 0,06	2,82 ± 0,22	0,68 ± 0,04
[Co(HAc4pClPh) ₂]Cl·1,5H ₂ O (8)	3,82 ± 0,01	1,41 ± 0,04	3,98 ± 0,18	0,88 ± 0,03
[Co(HAc4oClPh) ₂]Cl·3,5H ₂ O (9)	2,64 ± 0,01	0,98 ± 0,05	3,63 ± 0,13	0,83 ± 0,02
[Co(HAc4oNO ₂ Ph) ₂]Cl·3H ₂ O (11)	2,65 ± 0,01	0,98 ± 0,05	4,03 ± 0,16	0,91 ± 0,03

Os valores de n são próximos de 1, sugerindo que os complexos ligam-se ao ASH em uma proporção de 1:1. Os valores do logaritmo da constante de ligação (K_b) obtidos para o sistema [ASH-complexos (4-9) e (11)] em torno de $2,82 - 4,83 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ são próximos aos valores encontrados por outros compostos de coordenação,^{54,55} sugerindo que os complexos de cobalto(III) poderiam ser transportados por ASH.

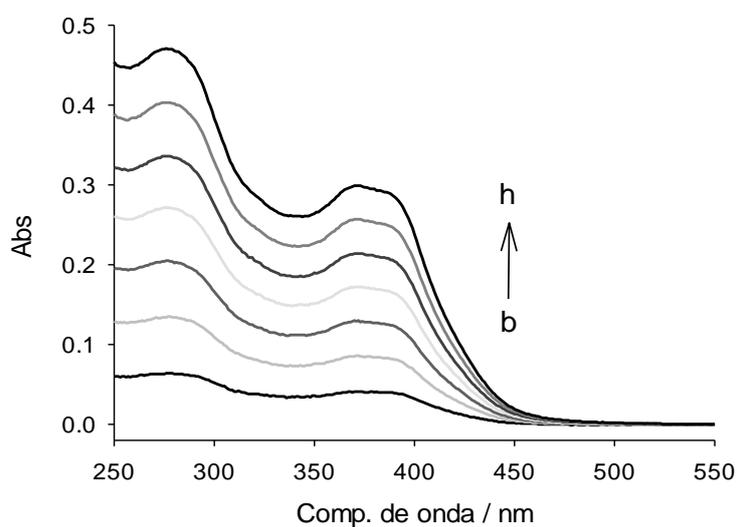


Figura 4.20 Espectro de absorção do complexo (4) nas concentrações (b-h):
1,67; 3,33; 4,98; 6,61; 8,24; 9,85 e 11,5 μM .

⁵⁴ A. Ray, B. K. Seth, U. Pal, S. Basu, *Spectrochim. Acta Part A* 92 (2012) 164.

⁵⁵ J. G. Da Silva, A. A. R. Despaigne, Sonia, R. W. Louro, C. C. Bandeira, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415.

Capítulo 5 Discussão e Conclusões

A Química Medicinal Inorgânica tem se dedicado à busca de novos metalofármacos e de ligantes para metalofármacos ou para a interação com metais presentes nos meios biológicos. A coordenação de ligantes orgânicos aos cátions metálicos pode levar à redução de alguns efeitos colaterais e também à redução da resistência celular, já que os mecanismos de resistência que reconhecem um composto orgânico podem não reconhecê-lo quando complexado a um cátion metálico. Além disso, o complexo metálico pode ser um veículo para a ativação do ligante como agente citotóxico. Levando todos esses fatores em consideração, torna-se interessante a escolha de metais e ligantes adequados visando a obtenção de compostos mais ativos e seletivos, com elevado índice terapêutico.

O desenvolvimento de compostos antitumorais à base de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina) constitui a maior contribuição da Química Medicinal Inorgânica para a medicina. No entanto, os efeitos colaterais adversos, o aparecimento de resistência celular e a faixa estreita de tumores que são tratados com esses compostos, levou à investigação de complexos com outros metais que pudessem ser administrados em combinação ou eventualmente substituir os complexos de platina. No presente trabalho investigamos complexos de rênio(I) e cobalto(III) como potenciais candidatos a protótipos de metalofármacos anticâncer.

Como já foi dito, hidrazonas e tiossemicarbazonas apresentam uma ampla faixa de aplicações farmacológicas. O presente estudo consistiu da síntese, caracterização e avaliação dos efeitos citotóxicos de complexos de rênio(I) e cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas, procurando-se explorar novas estratégias de planejamento de metalofármacos antitumorais

Deste modo, foram obtidos e caracterizados complexos inéditos de rênio(I) com 2-acetilpiridina-fenilhidrazona (H2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-clorofenilhidrazona (H2AcpClPh) e 2-acetilpiridina-*para*-nitrofenilhidrazona (H2AcpNO₂Ph): [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (1), [ReCl(CO)₃(H2AcpClPh)]·0,5C₇H₈ (2) e [ReCl(CO)₃(H2AcpNO₂Ph)]·0,5C₇H₈ (3).

Os complexos de rênio(I) não mostraram atividade significativa contra fungos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*). Este resultado é importante, uma vez que os compostos foram planejados para atuarem como agentes citotóxicos

contra tumores, e o fato de não apresentarem atividade antimicrobiana seria uma vantagem, uma vez que não provocariam o aparecimento de resistência contra fungos e bactérias.

Os complexos de rênio(I) apresentaram atividade antiproliferativa frente a células de carcinoma pulmonar humano NCI-H460, sendo que o melhor resultado foi obtido para o complexo (3). Além disso, os complexos de rênio(I) foram mais ativos do que as hidrazonas livres. Os complexos (1-3) também apresentaram citotoxicidade frente a células não-tumorais HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana), o que é interessante, uma vez que a inibição da proliferação de células endoteliais é um mecanismo chave para a angiogênese. Sendo assim, esses resultados direcionam para investigações futuras a respeito da influência dos complexos de rênio(I) no processo de angiogênese das células cancerígenas.

Para os complexos (2) e (3) foram realizados estudos de mecanismo de ação, por meio de ensaios de apoptose e dano mitocondrial em células NCI-H460. Ambos os compostos induziram apoptose com subsequente ruptura mitocondrial. Além disso, os complexos (2) e (3) exibiram alta atividade antioxidante (redução da produção de ROS) de maneira dose-dependente. Uma vez que os complexos não apresentaram atividade antimicrobiana, sua ação citotóxica contra células tumorais parece interessante em razão da especificidade.

Uma vez que os complexos de rênio(I) apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* frente a células NCI-H460, constitui perspectiva futura a obtenção dos complexos correspondentes com os radioisótopos ^{186}Re e ^{188}Re e a investigação da atividade citotóxica dos mesmos visando sua aplicação como fármacos e radiofármacos antitumorais. Seria interessante também a obtenção dos complexos análogos com o radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para serem aplicados como agentes de imagem para diagnóstico.

Finalmente, cabe ressaltar que complexos de rênio têm sido pouco investigados na literatura quanto à suas propriedades citotóxicas frente a células tumorais. O presente trabalho contribuiu para o avanço do conhecimento sobre o potencial de complexos de rênio como candidatos a metalofármacos antitumorais.

Na segunda parte do trabalho foi realizada uma investigação sobre a capacidade de complexos de cobalto(III) com bases de Schiff (hidrazonas e tiossemicarbazonas) de atuarem como Pró-Drogas Ativadas por Hipóxia (PDAHs). Assim, foram obtidos oito complexos de cobalto(III), sendo três destes derivados de H2AcPh, H2Ac p ClPh e H2Ac p NO $_2$ Ph: [Co(2AcPh) $_2$]Cl·2H $_2$ O (4), [Co(2Ac p ClPh) $_2$]Cl·3,5H $_2$ O (5) e [Co(2Ac p NO $_2$ Ph) $_2$]Cl·2,5H $_2$ O (6), e os demais derivados de 2-acetilpiridina-*N*(4)-feniltiossemicarbazona (H2Ac4Ph), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4 p ClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-clorofeniltiossemicarbazona (H2Ac4 o ClPh), 2-acetilpiridina-*N*(4)-*para*-

nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*p*NO₂Ph) e 2-acetilpiridina-*N*(4)-*orto*-nitrofeniltiossemicarbazona (H2Ac4*o*NO₂Ph): [Co(2Ac4Ph)₂]Cl·CH₃OH·0,5H₂O (7), [Co(2Ac4*p*ClPh)₂]Cl·1,5H₂O (8), [Co(2Ac4*o*ClPh)₂]Cl·3,5H₂O (9), [Co(2Ac4*p*NO₂Ph)₂]Cl·3H₂O (10) e [Co(2Ac4*o*NO₂Ph)₂]Cl·3H₂O (11). Dentre estes, apenas o complexo (7) não é inédito.

Estudos eletroquímicos mostraram que os complexos de cobalto(III) com hidrazonas (4-6) possuem potências de redução mais favoráveis do que complexos análogos com tiossemicarbazonas (7-11). Os valores de potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) obtidos para os complexos (4-6) encontram-se na faixa de redutores celulares. O comportamento quasi-reversível do processo de redução Co^{III}/Co^{II} dos complexos indica uma redução seletiva para região de hipóxia, uma vez que os mesmos teriam a capacidade de se reoxidarem na presença células oxigenadas, garantindo a não-liberação do ligante fora da região do tumor.

Estudos de redução, acompanhados por espectroscopia eletrônica, mostraram que o complexo (4) poderia ser reduzido na presença de 3 equivalentes molares de ditionito de sódio (DTN). A redução do complexo (4) pelo DTN com subsequente liberação do ligante H2AcPh foi confirmada por espectrometria de massas. Esses resultados indicam que os complexos de cobalto(III) com hidrazonas possuem características redox apropriadas para a redução em ambiente de hipóxia.

As hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina foram muito mais citotóxicas (CI₅₀ = 0,05 a 12,3 μM) do que o fármaco controle etoposídeo (CI₅₀ > 100 μM) frente a células de tumores sólidos MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116. No entanto, em alguns casos esses ligantes também se mostraram citotóxicos frente a células sadias Vero.

Considerando-se que nos complexos de cobalto(III) há dois ligantes por átomo de cobalto, verificou-se que de modo geral as hidrazonas e tiossemicarbazonas se mostraram mais ativas do que seus complexos frente a células leucêmicas (HL60, Jurkat e THP-1) e de tumores sólidos. Os melhores resultados foram observados para os complexos (7) e (8), que se mostraram consideravelmente menos ativos do que os ligantes H2Ac4Ph e H2Ac4*p*ClPh frente a células MCF-7, MDA-MB-231 e HCT-116. Além disso, esses compostos apresentaram valores de CI₅₀ > 100 μM contra células Vero. Esses resultados são interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de pró-drogas biorredutíveis uma vez que o complexo pode funcionar como carreador do agente ativo melhorando a seletividade do mesmo para a região de hipóxia.

O estudo da seletividade desses compostos para região de hipóxia foi realizado por meio da comparação da citotoxicidade dos complexos de cobalto(III) com hidrazonas (4-5) e tiossemicarbazonas (7-8) frente a células de tumor mamário MCF-7 cultivadas nos modelos

soft-agar (3D) e monocamada (2D). Ao contrário do esperado, foi observado que os compostos apresentam maior atividade frente a células MCF-7 cultivadas no modelo 2D quando comparado ao modelo 3D.

Levando em consideração os resultados promissores apresentados pelos complexos frente a células de tumores sólidos cultivadas no modelo 2D, estudos utilizando outras linhagens celulares de tumores sólidos tais como carcinomas mamário (MDA-MB-231) e colorretal (HCT-116) cultivadas no modelo tridimensional *soft-agar* seriam interessantes. Uma outra alternativa seria a utilização de diferentes métodos de controle da concentração de oxigênio durante os estudos com células, de forma a mimetizar o ambiente de hipóxia. O ambiente de hipóxia (ou pseudo-hipóxica) em experimentos celulares *in vitro* pode ser fornecido a partir de uma câmara de hipóxia ou através de indução bioquímica.¹

De um modo geral, os complexos de cobalto(III) com tiossemicarbazonas mostraram-se mais ativos do que os complexos com hidrazonas frente a bactérias *Gram*-positivas. Os complexos de hidrazonas mostraram ação antifúngica.

Apesar de as propriedades antimicrobianas não serem desejáveis em candidatos a protótipos de fármacos antitumorais, a estratégia de ativação em ambiente de hipóxia favoreceria uma maior seletividade dos compostos para os tumores, uma característica extremamente vantajosa.

No presente trabalho, mostramos que a investigação sobre complexos de cobalto(III) com hidrazonas e tiossemicarbazonas é relevante, se for demonstrado que algum ou alguns desses complexos possam atuar como PDAHs. Ou seja, o fato de termos demonstrado que os complexos com hidrazonas sofrem redução com liberação do ligante citotóxico com potenciais acessíveis aos redutores celulares constituiu uma prova de conceito, sugerindo que investigações futuras sobre esses compostos ou compostos análogos seriam de grande interesse.

Tanto os complexos de rênio(I), quanto os de cobalto(III) possuem a capacidade de suprimir a fluorescência exibida pela albumina sérica humana (ASH), através da formação de um complexo na proporção 1:1 (complexo metálico – ASH). As interações ocorrem por meio de um mecanismo estático, sugerindo que poderiam ser transportados por essa proteína que possui diversas funções fisiológicas no organismo.

¹ M. B. Byrne, M. T. Leslie, H. R. Gaskins, P. J. A. Kenis, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 556.

Levando em consideração a resistência e baixa seletividade apresentadas pelos fármacos em uso clínico, o presente trabalho representa uma importante contribuição para a ao estudo de novos candidatos a metalofármacos com ação citotóxica.

Anexos: artigos publicados



Cite this: *New J. Chem.*, 2016, 40, 7379

Tricarbonylrhenium(I) complexes with 2-acetylpyridine-derived hydrazones are cytotoxic to NCI-H460 human large cell lung cancer†

Camila Vargas Garcia,^a Gabrieli Lessa Parrilha,^a Bernardo Lages Rodrigues,^a Sarah Fernandes Teixeira,^b Ricardo Alexandre de Azevedo,^b Adilson Kleber Ferreira^b and Heloisa Beraldo^{*a}

Complexes [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H2AcpClPh)]·0.5C₇H₈ (**2**) and [ReCl(CO)₃(H2AcpNO₂Ph)]·0.5C₇H₈ (**3**) were obtained with 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (H2AcPh) and its *para*-chlorophenylhydrazone (H2AcpClPh) and *para*-nitrophenylhydrazone (H2AcpNO₂Ph) analogues. Coordination to tricarbonylrhenium(I) resulted in a higher antiproliferative activity against NCI-H460 human large cell lung cancer. Complexes (**2**) and (**3**) induced apoptosis on NCI-H460 cells. Complex (**2**) induced mitochondrial damage while treatment with **3** showed a later response, suggesting that probably the same effect would be observed at higher concentrations or longer treatments. Both complexes (**2**) and (**3**) showed a high antioxidant activity, **2** being more potent in reducing intracellular reactive oxygen species (ROS) production.

Received (in Victoria, Australia)
8th February 2016,
Accepted 15th June 2016

DOI: 10.1039/c6nj00050a

www.rsc.org/njc

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the leading cause of death worldwide. In spite of the high mortality rates depending on the type of cancer, a significant proportion of cancers can be cured through surgery, radiotherapy and/or chemotherapy.¹ Cisplatin, carboplatin and oxaliplatin are globally approved platinum-based anticancer drugs. However, serious side effects and tumor resistance to platinum drugs have become a challenging problem.² Hence, the development of novel metal-based compounds, with a pharmacological profile different from that of clinically established platinum drugs, is of great interest in medicinal chemistry.³

Hydrazones and their metal complexes are an important class of compounds which present applications as antimicrobial,^{4,5} anticonvulsant,^{6,7} analgesic and anti-inflammatory,^{8–10} and anticancer^{11–13} agents. 2-Acetylpyridine-derived hydrazones and their copper(II)¹⁴ and gallium(III)¹⁵ complexes are highly cytotoxic against solid tumor cells.

A variety of tricarbonylrhenium(I) complexes have been recently investigated for their pharmacological and radiopharmaceutical

applications.^{16–20} Due to the d⁶ electronic configuration of the rhenium(I) core in an octahedral field, its complexes are very well known to be kinetically inert. Hence, in spite of carbon monoxide toxicity due to its strong affinity for haemoglobin,²¹ high stability of substitution of the tightly bound CO ligands under ambient and/or physiological conditions has been verified for several *fac*-[Re(CO)₃]⁺ complexes in the solid state, in aqueous solution²² and in the human plasma.^{19,23}

Tricarbonylrhenium(I) complexes with different ligands proved to present antiproliferative activity against leukemia and solid tumor cells.^{16,17} It has been shown that tricarbonylrhenium(I) complexes with salicylaldehyde-derived semicarbazones exert antiproliferative effects on MOLT-4 human acute lymphoblastic leukemia cells with IC₅₀ values in the 1.0–24.0 μM range, and are non-toxic against non-cancerous human fibroblasts cells.¹⁸ However, the anticancer activity of rhenium(I) complexes with Schiff base-derived ligands has not received much attention in the literature.

In a previous investigation some of us demonstrated that 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (H2AcPh) and its *para*-chlorophenylhydrazone (H2AcpClPh) and *para*-nitrophenylhydrazone (H2AcpNO₂Ph) analogues were highly cytotoxic at nanomolar doses against U87 and T98 human glioma malignant cells.¹⁵ In the present work tricarbonylrhenium(I) complexes were obtained with the same hydrazones (Fig. 1). The compounds under study were assayed for their antiproliferative activity against human lung carcinoma NCI-H460 cells as well as against non-malignant human umbilical vein endothelial cells, HUVECs.

^a Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: hberaldo@ufmg.br

^b Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1040432, 1040434 and 1040435. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6nj00050a

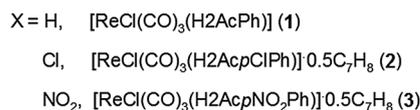
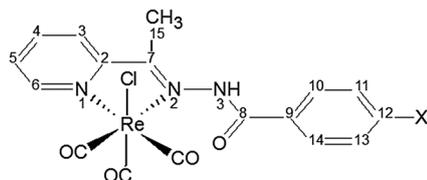


Fig. 1 Structural representation of tricarbonylrhenium(i) complexes with 2-acetylpyridine-derived hydrazones.

Experimental

Chemistry

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

Syntheses of 2-acetylpyridine-derived hydrazones

2-Acetylpyridine-phenylhydrazone (H2AcPh), its *para*-chlorophenylhydrazone (H2AcPClPh) and *para*-nitrophenylhydrazone (H2AcPNO₂Ph) analogues were prepared as previously described.^{5,24}

Syntheses of the tricarbonylrhenium(i) complexes

The rhenium(i) complexes were obtained by stirring under reflux a toluene solution of the desired hydrazone (1 mmol) with pentacarbonylrhenium(i) chloride in a 1 : 1 ligand-to-metal molar ratio for two hours. The obtained solids were washed with toluene and ether and then dried *in vacuo*. Crystals of complexes (1) and (3) were obtained from a solution in DMSO-*d*₆. Crystals of complex (2) were obtained upon recrystallization in 1 : 2 DMSO/methanol solution.

[[2-Acetylpyridinephenylhydrazone]chloro(tricarbonyl)rhenium(i)] $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})]$ (1). Orange solid. Yield: 0.485 g, 89%. Decomposition: 277 °C (from toluene). Anal. calc. for C₁₇H₁₃ClN₃O₄Re (FW = 544.96 g mol⁻¹): C, 37.47; H, 2.40; N, 7.71. Found: C, 37.80; H, 2.43; N, 7.47. Molar conductivity (1 × 10⁻³ M, DMF): 7.99 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, ν_{max} cm⁻¹): 2026, 1912 and 1896 ν(C≡O), 1670 ν(C=O), 1510 and 1478 ν(C=N). δ ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, Me₄Si): 12.53 (1H, s, N3-H), 9.06 (1H, d, H6), 8.49–8.33 (2H, m, H3 and H4), 7.86 (1H, t, H5). δ ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, Me₄Si): 198.1, 196.9 and 188.0 (C=O), 177.4 (C8), 162.4 (C7), 153.2 (C2), 153.1 (C6), 140.1 (C4), 129.5 (C5); 128.8 (C3).

[[2-Acetylpyridine-*para*-chlorophenylhydrazone]chloro(tricarbonyl)rhenium(i)] $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPClPh})] \cdot 0.5\text{C}_7\text{H}_8$ (2). Orange solid. Yield: 0.558 g, 89%. Decomposition: 272 °C (from toluene). Anal. calc. for C₁₇H₁₂Cl₂N₃O₄Re·0.5C₇H₈ (FW = 625.48 g mol⁻¹): C, 39.37; H, 2.58; N, 6.72. Found: C, 37.20; H, 2.34; N, 7.01. Thermogravimetry calc. for weight loss of toluene molecules (30–200 °C range): 7.37%. Found: 7.05%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ M, DMF): 7.86 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, ν_{max} cm⁻¹): 2028, 1912 and 1890 ν(C≡O), 1678 ν(C=O), 1596 and 1474 ν(C=N). δ ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, Me₄Si): 12.62 (1H, s, N3-H), 9.06 (1H, d, H6), 8.48–8.37 (2H, m, H3 and H4), 7.89–7.87 (1H, m, H5). δ ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, Me₄Si): 198.1, 196.9 and 187.9 (C≡O), 177.7 (C8), 161.4 (C7), 153.1 (C6), 140.1 (C4), 129.5 (C5), 128.9 (C3).

[[2-Acetylpyridine-*para*-nitrophenylhydrazone]chloro(tricarbonyl)rhenium(i)] $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPNO}_2\text{Ph})] \cdot 0.5\text{C}_7\text{H}_8$ (3). Orange solid. Yield: 0.526 g, 83%. Decomposition: 274 °C (from toluene). Anal. calc. for C₁₇H₁₂ClN₄O₆Re·0.5C₇H₈ (FW = 636.03 g mol⁻¹): C, 38.71; H, 2.54; N, 8.81. Found: C, 38.72; H, 2.50; N, 8.99. Thermogravimetry calc. for weight loss of toluene molecules (30–200 °C range): 7.26%. Found: 7.50%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ M, DMF): 7.87 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. IR (KBr, ν_{max} cm⁻¹): 2026, 1912 and 1892 ν(C≡O), 1682 ν(C=O), 1522 ν(C=N). δ ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, Me₄Si): 12.93 (1H, s, N3-H), 9.07 (1H, d, H6), 8.51–8.35 (4H, m, H3, H4, H12 and H13), 7.88 (1H, t, H5). δ ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, Me₄Si): 198.1, 197.0 and 187.9 (C≡O), 178.0 (C8), 160.9 (C7), 153.2 (C2), 153.1 (C6), 140.2 (C4), 129.6 (C3), 129.0 (C5).

Physical measurements

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Thermogravimetric curves were obtained using a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25–750 °C temperature range, under a dynamic nitrogen atmosphere at a heating rate of 5 °C min⁻¹. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000–400 cm⁻¹). NMR spectra were obtained using a Bruker DRX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and tetramethylsilane (Me₄Si) as internal reference.

X-ray crystallography

Single crystal X-ray diffraction measurements for $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPh})]$ (1), $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPClPh})] \cdot \text{DMSO}$ (2a) and $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{H2AcPNO}_2\text{Ph})] \cdot \text{DMSO}$ (3a) were performed on an Agilent-Gemini diffractometer using graphite-monochromated MoKα radiation. Data collection and data reduction were performed using the CrysAlisPro package, Version 1.171.35.21, from Agilent Technologies.

Biological activity

Cell lines and culture conditions. NCI-H460 human large cell lung cancer and human umbilical vein endothelial cells, HUVECs, were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MA, USA). Cells were maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Antiproliferative activity. The cellular viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(MTT) assay to determinate the half maximal inhibitory concentration of cellular viability (IC_{50}) values for each tested compound. NCI-H460 cells and HUVECs were seeded, at a concentration of 1×10^4 cells per well, in 96-flat bottom wells culture plates and cells were allowed to adhere for 2 h. Thereafter, cells were treated with each compound (0–200 μM) for 24 h, followed by exposure for 3 h to 10 μL of MTT (5 mg mL^{-1} in phosphate buffer solution, PBS, 1 \times) per well. Subsequently, plates were centrifuged and the formazan crystal formed by viable cells was dissolved in 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance, OD values, was measured on a microplate reader (VERSAmix Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA) at 538 nm. Finally, the cellular viability (%) relative to the control group was calculated using the equation $\text{ODT}/\text{ODC} \times 100\%$, where ODT represents the OD value of the treatment group and ODC represents the OD value of the control group.

Annexin V/propidium iodide apoptosis assay. Apoptotic feature determination used the FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen Inc., UK). NCI-H460 cells were planted in 12-well plates (5×10^5 cells per well) and, after adherence, cells were treated for 3 or 6 h with 10 μM of complexes (2) or (3). Subsequently, cells were harvested with cell scarper, washed in Annexin-binding buffer and stained with 1.5 μL of FITC Annexin V and 0.4 μL of the 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ propidium iodide (PI) working solution in binding buffer for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$ in the dark. The apoptotic cells were determined by acquiring 10 000 events per sample using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA). Data analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA, USA).

Measurement of mitochondrial membrane potential. NCI-H460 cells (5×10^5 cells per well) were seeded in 12-well plates and incubated overnight with 5, 10 or 20 μM of 2 or 3. After the treatment, cells were harvested and washed once with PBS and stained with tetramethylrhodamine methyl ester (TMRE) for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$. Then, cells were washed once with PBS/BSA 0.5% and kept at 4 $^\circ\text{C}$ during measurements. The mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry using a FACSCalibur cytofluorometer (Becton Dickinson, CA, USA). A total of 10 000 cells per sample were analyzed, and the mean fluorescence intensity was recorded. Data analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA, USA).

Measurement of ROS production. Intracellular production of reactive oxygen species (ROS) was assessed using a dihydroethidium (DHE) probe. NCI-H460 cells seeded in 12-well plates (5×10^5 cells per well) were treated overnight with 5, 10 or 20 μM of 2 or 3 after adherence. Then, cells were detached with trypsin 0.5%, gently washed with PBS/BSA 0.5% and incubated with 5 μM DHE at 37 $^\circ\text{C}$ for 15 min. The production of ROS by the cells was analyzed using a FACSCalibur cytofluorometer (Becton Dickinson, CA, USA) and a total of 10 000 events per sample were acquired. Data analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA, USA).

Statistical analyses. All the experiments were performed in triplicate. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The IC_{50} values were calculated by plotting the percentage of inhibition of cellular viability, assessed by the MTT assay,

versus logarithmic concentration of the compounds. Statistical analyses were performed using the Student's *t*-test to compare between sample groups, and two-way ANOVA's were performed followed by the *post hoc* Bonferroni test to determine differences among multiple groups. A *p*-value < 0.05 was considered significant ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). All analyses were performed using Graph-Pad Prism software, version 5.04 (LaJolla, CA, USA).

Results and discussion

[ReCl(CO)₃(HL)] rhenium(i) complexes were formed with 2-acetylpyridine-derived hydrazones

Microanalyses and molar conductivity data were compatible with the formation of [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (1), [ReCl(CO)₃(H2AcpClPh)]·0.5C₇H₈ (2) and [ReCl(CO)₃(H2AcpNO₂Ph)]·0.5C₇H₈ (3), in which one neutral hydrazone is attached to the metal center along with a chloride and three carbonyl ligands. The presence of crystallization toluene molecules in complexes (2) and (3) was confirmed by their thermogravimetric curves, which showed weight losses of 7.05% (calcd. 7.37%) for (2) and 7.50% (calcd. 7.26%) for (3).

In complexes (1–3) a neutral hydrazone ligand in the E configuration is attached to the tricarbonylrhenium(i) center through the N_{py}–N chelating system

The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{N})$ at 1588–1580 cm^{-1} in the infrared spectra of the free hydrazones shift to 1604–1597 cm^{-1} in the spectra of the complexes, in agreement with coordination of the azomethine nitrogen.^{15,25–28} In addition, vibrational stretches at 2028–1890 cm^{-1} were attributed to the carbonyl ligands ($\text{C} \equiv \text{O}$).^{29,30} The existence of three strong bands in the 2028–1890 cm^{-1} range in the spectra of complexes (1–3) is consistent with the presence of the carbonyl ligands in a facial arrangement^{29,30} as observed for [Re(CO)₃Br(Hapbhyd)]³¹ (Hapbhyd = 2-acetylpyridine-phenylhydrazone), [Re(CO)₃(L¹)]³² (HL¹ = 2-acetylpyridine-phenylthiosemicarbazone) and [Re(CO)₃-X{H₂(py)L²}]³³ (H₂(py)L² = 2-acetylpyridine-salicyloylhydrazone, X = Cl or Br) (see Fig. 2). In addition, the fact that the carbonyl oxygen does not coordinate to the rhenium center was expected, since the [Re(CO)₃]⁺ core has a high tendency to coordinate to nitrogen donor atoms, as observed in other tricarbonylrhenium(i) complexes with hydrazones.^{30,31,33}

The NMR spectra of the hydrazone ligands and their rhenium(i) complexes were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

In the ¹H NMR spectra of the hydrazones (DMSO-*d*₆), except for H2AcpNO₂Ph, all signals were duplicated, indicating the presence of the *Z* and *E* configurational isomers in the DMSO-*d*₆ solution. In the first, N3–H is hydrogen bonded to

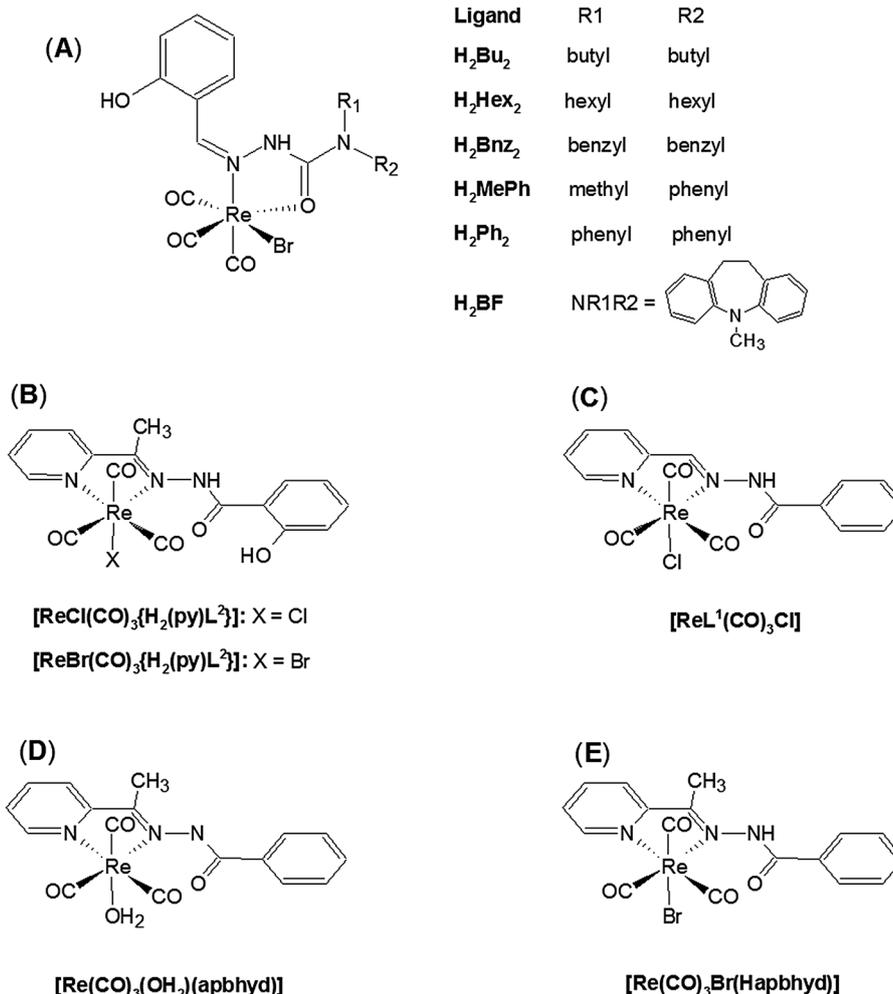


Fig. 2 Structural representations of tricarbonylrhenium(i) complexes with salicylaldehyde-derived semicarbazones (A);¹⁸ 2-acetylpyridine-salicyloylhydrazone (H₂(py)L²) (B);³³ 2-formylpyridine-phenylhydrazone (L¹) (C);³⁰ and 2-acetylpyridine-phenylhydrazones (Hapbhyd) (D and E).³¹

the heteroaromatic nitrogen (δ 14.72–15.86), while in the second N3–H is hydrogen bonded to the solvent (δ 11.21–10.90).^{5,15} In the ¹H NMR spectrum of H2AcpNO₂Ph only one signal was observed for each hydrogen (N3–H at δ 11.21), suggesting the presence of only the *E* isomer.^{5,15}

In the spectra of the rhenium(i) complexes (DMSO-*d*₆) only one signal was observed for all hydrogens, indicating the existence of only one configuration in solution. The signals of N3–H were observed at δ 12.53–12.93 in accordance to the presence of neutral hydrazone ligands. In the spectra of 1–3 the signals of all hydrogen atoms undergo significant shifts in relation to their positions in the uncomplexed hydrazones. Similarly, the signals of C=N and the pyridine carbons undergo significant shifts, indicating coordination through the N_{py}–N chelating system. Hence, in the rhenium(i) complexes the hydrazones adopt the *E* configuration.

The presence of toluene solvation molecules was confirmed by the appearance of two signals at δ 7.24–7.18 (multiplet) and δ 2.29 (singlet) for complex (2) and at δ 7.28–7.14 (multiplet) and δ 2.29 (singlet) for complex (3).

Crystal structures of [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (1), [ReCl(CO)₃(H2AcpClPh)]·DMSO (2a) and [ReCl(CO)₃(H2AcpNO₂Ph)]·DMSO (3a) reveal that the carbonyl oxygen does not coordinate to the rhenium(i) center

Fig. 3 shows the ORTEP³⁴ representation of [ReCl(CO)₃(H2AcPh)] (1), [ReCl(CO)₃(H2AcpClPh)]·DMSO (2a) and [ReCl(CO)₃(H2AcpNO₂Ph)]·DMSO (3a). Crystal data and refinement results are listed in Table 1. Table 2 presents selected intramolecular bond distances and angles in the structures of 1, 2a and 3a.

The unit cell parameters were obtained by least-squares refinement based on the angular settings for all collected reflections. Empirical absorption corrections were applied for the collected data. The structures were solved by direct methods, completed through Fourier difference maps, and refined (full matrix, *F*²) with the SHELX package.³⁵ Hydrogen atoms were geometrically included and refined considering the riding model.

The crystal structures of 1, 2a and 3a reveal that the hydrazone ligand is attached to the rhenium(i) center through the N_{py}–N bidentate chelating system. Although the literature reports that the studied hydrazones coordinate to different

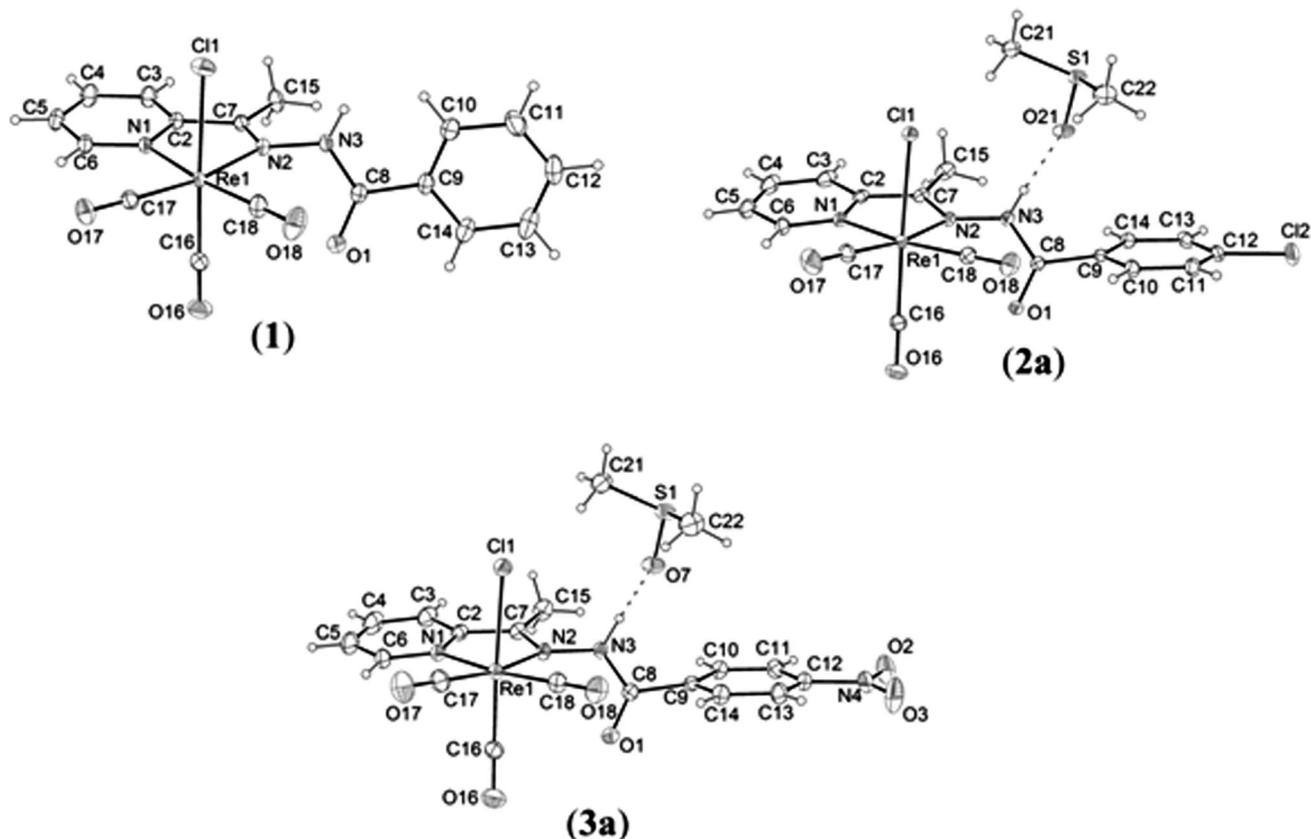


Fig. 3 ORTEP³⁴ drawings of [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H₂AcpClPh)]·DMSO (**2a**) and [ReCl(CO)₃(H₂AcpNO₂Ph)]·DMSO (**3a**) showing the labeling of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 30% probability level.

Table 1 Crystal data and structure refinement for [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H₂AcpClPh)]·DMSO (**2a**) and [ReCl(CO)₃(H₂AcpNO₂Ph)]·DMSO (**3a**)

	(1)	(2a)	(3a)
Empirical formula	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₃ O ₄ Re	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₃ O ₅ ReS	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₄ O ₇ ReS
Formula weight (g mol ⁻¹)	544.95	657.52	668.08
Temperature (K)	293(2)	200(2)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system, space group	Monoclinic, <i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	Triclinic, <i>P</i> $\bar{1}$	Triclinic, <i>P</i> $\bar{1}$
Crystal size (mm)	0.10 × 0.05 × 0.02	0.15 × 0.07 × 0.02	0.10 × 0.05 × 0.02
Unit cell dimensions			
<i>a</i> (Å)	12.6872(2)	8.7687(4)	8.8972(5)
<i>b</i> (Å)	9.5720(2)	11.1002(5)	11.1200(6)
<i>c</i> (Å)	14.9830(2)	12.9282(5)	12.9995(6)
α (°)	90	113.002(4)	112.409(4)
β (°)	98.300(2)	97.163(4)	96.989(4)
γ (°)	90	93.603(4)	93.490(4)
Volume (Å ³)	1800.51(5)	1140.66(9)	1172.08(11)
<i>Z</i> , calculated density (mg m ⁻³)	4, 2.01	2, 1.914	2, 1.893
$\sin(\theta)/\lambda_{\max}$ (Å ⁻¹)	0.767	0.764	0.694
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	6.925	5.688	5.434
<i>F</i> (000)	1040	636	648
Limiting indices	-19 ≤ <i>h</i> ≤ 19 -14 ≤ <i>k</i> ≤ 13 -22 ≤ <i>l</i> ≤ 22	-13 ≤ <i>h</i> ≤ 13 -16 ≤ <i>k</i> ≤ 16 -19 ≤ <i>l</i> ≤ 19	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 10 -11 ≤ <i>k</i> ≤ 15 -17 ≤ <i>l</i> ≤ 17
Reflections collected/unique (<i>R</i> _{int})	39210/6375 (0.036)	35574/7953 (0.049)	8702/5446 (0.0405)
Observed (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	5218	7050	4883
Completeness	100%, θ = 25.24	100%, θ = 25.24	100%, θ = 26.32
Absorption correction	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan
Data/restraints/parameters	6375/0/235	7953/0/283	5446/0/300
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.189	1.061	1.089
<i>R</i> (<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²))	0.0226	0.0255	0.0300
w <i>R</i> (<i>F</i> ²)	0.0662	0.0508	0.0720
<i>T</i> _{min} , <i>T</i> _{max}	0.534, 1.000	0.555, 1.000	0.676, 1.000

Table 2 Selected bond distances (Å) and angles (°) for [ReCl(CO)₃-(H₂AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)]·DMSO (**2a**) and [ReCl(CO)₃-(H₂AcPhNO₂Ph)]·DMSO (**3a**)

	(1)	(2a)	(3a)
C7–N2	1.285(4)	1.290(3)	1.295(5)
N2–N3	1.409(3)	1.395(2)	1.403(4)
N3–C8	1.350(4)	1.356(3)	1.354(6)
C8–O1	1.223(4)	1.217(3)	1.220(5)
C8–C9	1.493(4)	1.500(3)	1.506(6)
Re1–N1	2.163(2)	2.156(2)	2.157(3)
Re1–N2	2.187(2)	2.2069(18)	2.201(3)
Re1–Cl1	2.4872(8)	2.4851(6)	2.4877(12)
Re1–C16	1.911(3)	1.905(3)	1.898(5)
Re1–C17	1.909(3)	1.904(2)	1.900(5)
Re1–C18	1.912(3)	1.915(2)	1.913(4)
C2–C7–N2	115.0(2)	114.6(2)	114.5(4)
C2–C7–C15	119.7(3)	119.8(2)	119.4(4)
C7–N2–N3	117.1(2)	117.40(19)	116.5(3)
N2–N3–C8	120.4(2)	118.87(18)	118.6(4)
N3–C8–O1	121.9(3)	123.6(2)	124.2(4)
N3–C8–C9	115.9(3)	115.07(19)	115.5(4)
C16–Re1–C17	90.27(13)	88.34(11)	88.6(2)
C16–Re1–C18	88.92(14)	88.45(11)	88.5(2)
C16–Re1–N1	93.90(11)	95.47(10)	95.75(17)
C16–Re1–N2	94.13(11)	96.98(9)	97.01(17)
C16–Re1–Cl1	176.45(10)	177.86(7)	177.53(14)
C17–Re1–N1	97.63(11)	98.32(10)	96.91(17)
C17–Re1–N2	170.22(11)	170.27(9)	169.06(17)
C17–Re1–Cl1	92.77(9)	93.30(8)	93.19(17)
C18–Re1–C17	87.93(13)	89.00(11)	89.30(19)
C18–Re1–N1	173.73(11)	171.77(9)	172.55(16)
C18–Re1–N2	100.72(11)	99.25(8)	100.18(15)
C18–Re1–Cl1	92.40(11)	90.20(8)	89.85(15)
N1–Re1–N2	73.51(9)	73.13(7)	73.26(13)
N1–Re1–Cl1	84.46(6)	85.67(6)	85.70(10)
N2–Re1–Cl1	82.39(7)	81.61(5)	81.47(10)

metals through the tridentate N_{py}–N–O system,^{5,15,36,37} the facial arrangement of the [Re(CO)₃]⁺ core prevents tridentate coordination, as observed in the crystal and molecular structures of other tricarbonylrhenium(i) complexes with related hydrazones.^{30,31,33}

Hence, the Re atom of each compound (**1**, **2a** and **3a**) is coordinated to three CO groups, one chlorine atom and two nitrogen atoms of the hydrazone ligand while the carbonyl oxygen does not bind to the metal. The octahedral coordination sphere of the metal is similar to previously reported Re–hydrazone complexes. The Re–CO bond distances are very close to each other in **1**, **2a** and **3a**. Concerning the Re–N bond distances, it is observed that d[Re–N1] and d[Re–N2] are close to each other for complex (**1**). These features had been previously observed for *fac*-[Re(CO)₃L¹Cl] (L¹ = 2-formylpyridine-phenylhydrazone)³⁰ and [Re(CO)₃Br(Hapbhyd)] (Hapbhyd = 2-acetylpyridine-phenylhydrazone).³¹ Complexes (**2a**) and (**3a**), on the other hand, show d[Re–N1] around 2.15 Å and d[Re–N2] somehow longer (around 2.21 Å).

The crystal packing of each complex is stabilized by hydrogen bonds involving nitrogen N3 as the donor (Table 3). Complexes (**2a**) and (**3a**), which have a DMSO molecule in the crystal structure, present medium-strength hydrogen bonds between nitrogen N3 and the DMSO oxygen, with d[N3–O(DMSO)] equal to 2.750(3) Å and 2.734(5) Å, respectively. These hydrogen

Table 3 Hydrogen bonds (Å and °) in the structure for [ReCl(CO)₃-(H₂AcPh)] (**1**), [ReCl(CO)₃(H₂AcPh)]·DMSO (**2a**) and [ReCl(CO)₃-(H₂AcPhNO₂Ph)]·DMSO (**3a**)

Complex	A–H···B	D···A	D–H	H···A	<(DHA)
(1)	N3–H3···Cl1 ⁱ	3.317(3)	0.86	2.48	166.0
(2a)	N3–H3···O21	2.750(3)	0.86	1.89	175.5
(3a)	N3–H3···O7	2.734(5)	0.926(4)	1.829(3)	165.3(2)

Symmetry operations: ⁱ –x, –y, 1 – z.

bonds affect the molecular conformation causing a rotation in the C8–C9 bond of the complexes. In **2a** and **3a** the angles between the least-squares planes A (through atoms C8, C9, C10, C11, C12, C13 and C14) and B (through atoms N3, C9 and O1) are close to each other (54.75(9)° for **2a** and 54.78(16)° for **3a**). Complex (**1**), on the other hand, has an intermolecular hydrogen bond between N3 and Cl1 (d[N3···Cl1] = 3.317(3) Å). For this complex the angle between planes A and B is equal to 25.55(19)°, clearly different from the reported angles of **2a** and **3a**. It is also interesting to notice the difference between the least squares planes C (through the pyridine ring) and D (through the benzene ring). The crystal structure of complex (**1**) shows the two aromatic rings almost perpendicular to each other (the angle between the planes is equal to 82.05(12)°) while the crystal structures of complexes (**2a**) and (**3a**) present these planes almost parallel to each other (the angles between planes C and D are equal to 11.55(15)° for **2a** and 9.95(30)° for **3a**).

Biological activity

Tricarbonylrhenium(i) complexes with hydrazones are cytotoxic to NCI-H460 cells. In order to evaluate the effect of coordination to tricarbonylrhenium(i) on the antiproliferative activity of the hydrazones, the antiproliferative effect of complexes (**1–3**), the corresponding hydrazone ligands and the rhenium(i) precursor [ReCl(CO)₅] were tested *in vitro* against non-small lung cancer (NSCLC) NCI-H460 cells and against human umbilical vein endothelial cells, HUVECs.

After 24 h treatment, all complexes (**1–3**) proved to be more cytotoxic to NCI-H460 cells than the free hydrazone ligands and than pentacarbonylchlororhenium(i) used as a precursor in syntheses. Complex (**3**) revealed to be the most cytotoxic. However, upon coordination to tricarbonylrhenium(i), cytotoxicity against non-malignant HUVECs also increased (see Table 4). Hence, complexation with tricarbonylrhenium(i) resulted in higher cytotoxicity with no specificity.

Tricarbonylrhenium(i) complexes with hydrazones induce apoptosis and mitochondrial damage on NCI-H460 cells. After the initial evaluation of the rhenium complexes activity against cell lines, a study on their mechanisms of action was carried out for the most cytotoxic complexes (**2** and **3**). We performed a flow cytometric analysis of apoptotic cells double stained with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) after 3 and 6 hours treatment with complexes (**2**) and (**3**) on NCI-H460 cells. Both compounds induced apoptosis on NCI-H460 cells at 10 μM after 3 or 6 hour treatments (Fig. 4A and B). Complex (**2**) already

Table 4 IC₅₀ (μM) values for 2-acetylpyridine-derived hydrazones, their complexes (**1–3**) and the [ReCl(CO)₃] precursor against NCI-H460 cells and HUVECs

Compound	NCI-H460	HUVEC
H2AcPh	> 200	> 200
[ReCl(CO) ₃ (H2AcPh)] (1)	58.51 (±7.18)	32.16 (±7.03)
H2AcPh	74.65 (±2.91)	> 200
[ReCl(CO) ₃ (H2AcPh)]·0.5C ₇ H ₈ (2)	20.51 (±0.38)	22.55 (±6.00)
H2AcPhNO ₂	26.95 (±5.19)	20.58 (±1.57)
[ReCl(CO) ₃ (H2AcPhNO ₂)]·0.5C ₇ H ₈ (3)	16.15 (±1.45)	22.48 (±5.38)
[ReCl(CO) ₃]	> 200	> 200

Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

shows its maximum effect after 3 hour treatment. On the other hand, **3** has a later response. Mitochondria shelter key regulators that trigger apoptosis when released. Therefore, the evaluation of its membrane integrity by the alteration on mitochondrial membrane potential is important.^{38–41} Next, we evaluated if the compounds could induce apoptosis by a mitochondrial pathway. Interestingly, only the highest concentration of **2** was able to

reduce mitochondrial membrane potential; the other conditions even resulted in a slight increase of mitochondrial membrane potential (Fig. 4C). These data indicate that probably the mitochondrial damage induced by **2** is a consequence of apoptosis. Treatment with complex (**3**) showed a later response, as seen in the Annexin V/PI assay, then, probably the same effect would be observed at higher concentrations or longer treatments. Therefore, the tricarbonylrhenium(i) complexes induce apoptosis with subsequent mitochondrial disruption.

Tricarbonylrhenium(i) complexes with hydrazones reduce ROS production on NCI-H460. Oxidative stress driven by unbalance between antioxidant mechanisms and ROS production is related to several cellular responses, leading to cell proliferation, differentiation, and apoptosis.^{42–44} Furthermore, oxidative stress could trigger apoptosis *via* both the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways.⁴⁵ Given the relation of these phenomena and cellular survival, ROS production after overnight treatment with 5, 10 or 20 μM of complex (**2**) or (**3**) on NCI-H460 cells was analysed by DHE probe staining (Fig. 5). Notably, both complexes (**2**) and (**3**) show a high antioxidant

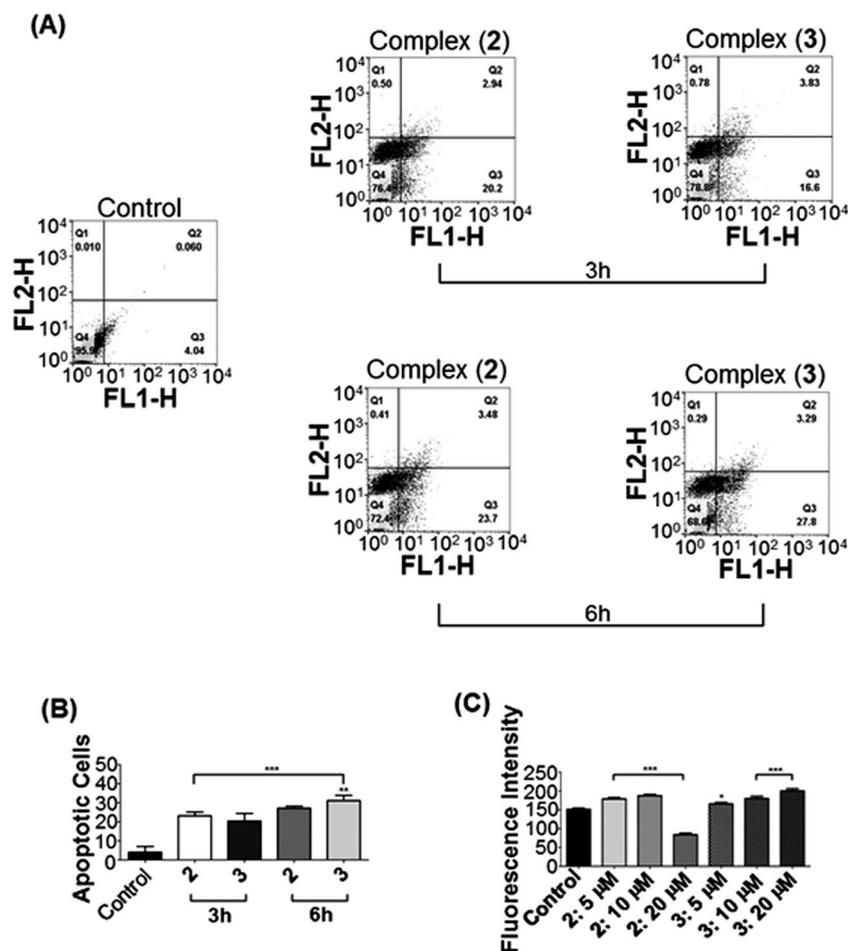


Fig. 4 Tricarbonylrhenium(i) complexes with hydrazones trigger apoptosis on NCI-H460 cells with later mitochondrial disruption. (A) Flow-cytometry staining using Annexin V/PI of NCI-H460 cells after 3 or 6 hour treatment with complexes (**2**) and (**3**) at 10 μM. (B) Apoptotic cells, Annexin V+, of lung cancer cells treated with **2** or **3** were quantified. (C) The mean fluorescence of positive cells stained with TMRE was used to assess changes in the mitochondrial membrane potential observed in apoptotic cells by flow-cytometry after overnight treatment with **2** and **3** at 5, 10 or 20 μM. The data shown are the means ± SD from three independent experiments. **p* < 0.05 versus control and ****p* < 0.001 versus control.

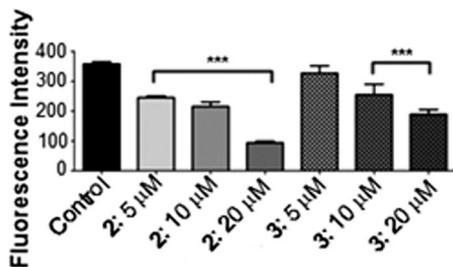


Fig. 5 Tricarbonylrhenium(i) complexes with hydrazones induce ROS scavenging. NCI-H460 cells were treated overnight with complexes (2) and (3) at 5, 10 or 20 μ M and stained with DHE to assess changes in ROS production observed in apoptotic cells by flow-cytometry. The results are represented as the mean fluorescence of positive cells stained with DHE. The data shown are the means \pm SD from three independent experiments. *** $p < 0.001$ versus control.

activity in a dose-dependent manner. However, 2 proved to be more potent as an antioxidant on NCI-H460 cells, reducing ROS production even at 5 μ M concentration. These data show that the reduction of ROS production induced by 2 may be mainly related to an antioxidant property of the complex, since it was not able to induce mitochondrial damage at the same concentration.

Conclusions

Coordination of 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (H2AcPh) and its *para*-chlorophenylhydrazone (H2AcPClPh) and *para*-nitrophenylhydrazone (H2AcPNO₂Ph) analogues to tricarbonylrhenium(i) resulted in a higher antiproliferative activity against human lung carcinoma NCI-H460 cells. The mechanism of action of complexes (2) and (3) probably involves apoptosis induction and intracellular ROS scavenging.

Although complexes (2) and (3) did not show selectivity to NCI-H460 cells under the experimental conditions, the *in vitro* cell viability study in HUVECs in the presence of the complexes suggested the inhibition of endothelial cell proliferation, which is a key step of angiogenesis.^{46,47} The effect of complexes (2) and (3) on angiogenesis, which is beyond the scope of the present work, will be investigated in a forthcoming study.

The literature reports that both small cell and non-small cell lung cancer overexpress somatostatin receptors (SSTRs). A phase I trial revealed that the ¹⁸⁸Re-labelled P2045 peptide, a somatostatin analogue, was promising for treating advanced lung cancer.⁴⁸ These results, together with those obtained in the present work, suggest that future investigation on the antiproliferative activity of ¹⁸⁸Re(i)-tricarbonyl complexes with the hydrazones under study or their analogues could be of utmost relevance.

The present work constitutes an important contribution to the knowledge of the antineoplastic properties of tricarbonylrhenium(i) complexes and provided preliminary information on their mode of action.

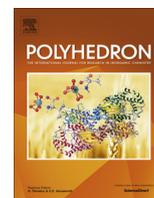
Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, CAPES, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) and FAPESP (Brazil).

References

- 1 A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman, *Ca-Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 69–90.
- 2 X. Chen, Y. Wu, H. Dong, C.-Y. Zhang and Y. Zhang, *Curr. Mol. Med.*, 2013, **13**, 1603–1612.
- 3 C. Nardon, G. Boscutti and D. Fregona, *Anticancer Res.*, 2014, **34**, 487–492.
- 4 P. Vicini, F. Zani, P. Cozzini and I. Doytchinova, *Eur. J. Med. Chem.*, 2002, **37**, 553–564.
- 5 A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. da Costa, N. L. Speziali and H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2010, **21**, 1247–1257.
- 6 J. Jain, Y. Kumar, R. Sinha, R. Kumar and J. Stables, *J. Med. Chem.*, 2011, **7**, 56–61.
- 7 S. K. Sridhar, S. N. Pandeya, J. P. Stables and A. Ramesh, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002, **16**, 129–132.
- 8 C. M. Moldovan, O. Oniga, A. Pâravu, B. Tiperciuc, P. Verite, A. Pîrnău, O. Criian, M. Bojiță and R. Pop, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 526–534.
- 9 A. A. M. Eissa, N. A. H. Farag and G. A. H. Soliman, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 5059–5070.
- 10 R. S. Hoonur, B. R. Patil, D. S. Badiger, R. S. Vadavi, K. B. Gudasi, P. R. Dandawate, M. M. Ghaisas, S. B. Padhye and M. Nethaji, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 2277–2282.
- 11 D. B. Lovejoy and D. R. Richardson, *Blood*, 2002, **100**, 666–676.
- 12 D. R. Richardson, E. H. Tran and P. Ponka, *Blood*, 1995, **86**, 4295–4306.
- 13 L. Savini, L. Chiasserini, V. Travagli, C. Pellerano, E. Novellino, S. Cosentino and M. B. Pisano, *Eur. J. Med. Chem.*, 2004, **39**, 113–122.
- 14 A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, P. R. da Costa, R. G. dos Santos and H. Beraldo, *Molecules*, 2014, **19**, 17202–17220.
- 15 A. A. R. Despaigne, G. L. Parrilha, J. B. Izidoro, P. R. da Costa, R. G. dos Santos, O. E. Piro, E. E. Castellano, W. R. Rocha and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **50**, 163–172.
- 16 J. Zhang, J. J. Vittal, W. Henderson, J. R. Wheaton, I. H. Hall, T. S. A. Hor and Y. K. Yan, *J. Organomet. Chem.*, 2002, **650**, 123–132.
- 17 W. Wang, Y. K. Yan, T. S. A. Hor, J. J. Vittal, J. R. Wheaton and I. H. Hall, *Polyhedron*, 2002, **21**, 1991–1999.
- 18 J. Ho, W. Y. Lee, K. J. T. Koh, P. P. F. Lee and Y.-K. Yan, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **119**, 10–20.
- 19 R. Alberto, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram and A. P. Schubiger, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190–192**, 901–919.
- 20 R. Huang, G. Langille, R. K. Gill, C. M. J. Li, Y. Mikata, M. Q. Wong, D. T. Yapp and T. Storr, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, **18**, 831–844.
- 21 R. Foresti, M. G. Bani-Hani and R. Motterlini, *Intensive Care Med.*, 2008, **34**, 649–658.
- 22 E. Kianfar, C. Schäfer, M. R. Lornejad-Schäfer, E. Portenkirchner and G. Knör, *Inorg. Chim. Acta*, 2015, **435**, 174–177.
- 23 I. Kitanovic, S. Can, H. Alborzina, A. Kitanovic, V. Pierroz, A. Leonidova, A. Pinto, B. Spingler, S. Ferrari, R. Molteni,

- A. Steffen, N. Metzler-Nolte, S. Wölfl and G. Gasser, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 2496–2507.
- 24 S. Choudhary and J. R. Morrow, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 4096–4098.
- 25 A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, A. C. M. do Carmo, O. E. Piro, E. E. Castellano and H. Beraldo, *J. Mol. Struct.*, 2009, **920**, 97–102.
- 26 A. A. R. Despaigne, J. G. da Silva, A. C. M. do Carmo, F. Sives, O. E. Piro, E. E. Castellano and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2009, **28**, 3797–3803.
- 27 A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, A. C. M. do Carmo, O. E. Piro, E. E. Castellano and H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 2117–2122.
- 28 G. L. Parrilha, R. P. Vieira, A. P. Rebolledo, I. C. Mendes, L. M. Lima, E. J. Barreiro, O. E. Piro, E. E. Castellano and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2011, **30**, 1891–1898.
- 29 N. Lazarova, J. Babich, J. Valliant, P. Schaffer, S. James and J. Zubietta, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 6763–6770.
- 30 S. Basak, D. Chopra and K. K. Rajak, *J. Organomet. Chem.*, 2008, **693**, 2649–2656.
- 31 J. Grewe, A. Hagenbach, B. Stromburg, R. Alberto, E. Vazquez-Lopez and U. Abram, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2003, **629**, 303–311.
- 32 I. G. Santos, U. Abram, R. Alberto, E. V. Lopez and A. Sanches, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 1834–1836.
- 33 P. Barbazán, R. Carballo, I. Prieto, M. Turnes and E. M. Vázquez-López, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 3102–3111.
- 34 C. K. Johnson, *ORTEP-II. Report ORNL-5318*, Oak Ridge National Laboratory, TN, USA, 1976.
- 35 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, 2015, **C71**, 3–8.
- 36 A. A. R. Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2012, **38**, 285–290.
- 37 E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, I. P. Ferreira, J. A. Takahashi and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2015, **97**, 30–38.
- 38 R. A. Gottlieb, *FEBS Lett.*, 2000, **482**, 6–12.
- 39 P. Parone, M. Priault, D. James, S. F. Nothwehr and J.-C. Martinou, *Essays Biochem.*, 2003, **39**, 41–51.
- 40 M. O. Hengartner, *Nature*, 2000, **407**, 770–776.
- 41 C. Adrain and S. J. Martin, *Trends Biochem. Sci.*, 2001, **26**, 390–397.
- 42 L. J. Yan, *Redox Biol.*, 2014, **2**, 165–169.
- 43 V. I. Lushchak, *Chem.-Biol. Interact.*, 2014, **224**, 164–175.
- 44 P. V. Raninga, G. D. Trapani and K. F. Tonissen, *Oncoscience*, 2014, **1**, 95–110.
- 45 K. Sinha, J. Das, P. B Pal and P. C. Sil, *Arch. Toxicol.*, 2013, **87**, 1157–1180.
- 46 P. Nagababu, A. K. Barui, B. Thulasiram, C. S. Devi, S. Satyanarayana, C. R. Patra and B. Sreedhar, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 5226–5241.
- 47 H. Lai, Z. Zhao, L. Li, W. Zheng and T. Chen, *Metallomics*, 2015, **7**, 439–447.
- 48 M. J. Edelman, G. Clamon, D. Kahn, M. Magram, J. Lister-James and B. R. Line, *J. Thorac. Oncol.*, 2009, **4**, 1550–1554.



Cobalt(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived Schiff bases: Studies investigating ligand release upon reduction



Camila V. Garcia^a, Gabrieli L. Parrilha^a, Bernardo L. Rodrigues^a, Paulo J.S. Barbeira^a, Ryan M. Clarke^b, Tim Storr^b, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Chemistry, Simon Fraser University, V5A-1S6 Burnaby, BC, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2016

Accepted 18 December 2016

Available online 28 December 2016

Keywords:

Hydrazones

Thiosemicarbazones

Cobalt(III) complexes

Reduction

Ligand release

ABSTRACT

Cobalt(III) complexes $[\text{Co}(\text{L1})_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{Co}(\text{L2})_2]\text{Cl}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{Co}(\text{L3})_2]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) and $[\text{Co}(\text{L4})_2]\text{Cl}\cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**4**) were obtained with 2-acetylpyridine-*N*(4)-phenylthiosemicarbazone (HL1), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*para*-chlorophenylthiosemicarbazone (HL2), 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (HL3) and 2-acetylpyridine-*para*-chlorophenylhydrazone (HL4). The complexes were characterized by means of microanalyses, molar conductivities and their infrared and ¹H and ¹³C NMR spectra. Electrochemical studies showed that the Co^{III}/Co^{II} reduction potential of complexes (**3**) and (**4**) but not of complexes (**1**) and (**2**) are suitable for the compounds to be reduced by cellular reductants. Reactivity assays showed that complex (**3**) undergoes reduction by sodium dithionite with subsequent ligand release. The results suggested that coordination of 2-acetylpyridine-derived hydrazones with cytotoxic activity to cobalt(III) results in compounds which are able to release the bioactive ligand upon reduction. In addition, the cobalt(III) complexes under study interacted with human serum albumin (HSA), indicating that they could be transported by this protein.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thiosemicarbazones and hydrazones are compounds possessing a wide range of pharmacological applications as antimicrobial, antiparasitic and antitumor agents [1–4]. Coordination of these compounds to metal ions in some cases results in improvement of their bioactivities [5].

In a previous work we demonstrated that upon complexation of *N*(4)-tolyl-2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones to gold (III), platinum(II) and platinum(IV) the cytotoxic activity against glioma tumor cells increased [6]. We also showed that bismuth (III), antimony(III), gallium(III), palladium(II), platinum(II) and tin (IV) complexes with 2-acetylpyridine-*N*(4)-*ortho*-chlorophenylthiosemicarbazone are cytotoxic to MCF-7 and HT-29 solid tumor cells [7], and that gallium(III) [8], bismuth(III) [9] and rhodium(I) [10] complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones present cytotoxic effects against solid tumor and leukemia cells.

Cobalt(III) complexes have attracted much attention as anti-cancer drug candidates. Cobalt(III) complexes with 2-furfural thiosemicarbazone and semicarbazone showed potent cytotoxicity against the growth of suspended leukemia and lymphomas, as well as against human lung MB9812, colon SW480, ovary 1-A9 and HeLa-S3 uterine carcinoma cells [11]. Cobalt(III) complexes with pyridoxal-derived thiosemicarbazones also demonstrated cytotoxic activity against MCF-7 human breast carcinoma and human cervix HeLa carcinoma cell lines [12].

Recently cobalt(III) complexes have been investigated as potential hypoxia-activated prodrugs [13–18]. The cobalt(III) complexes are designed to undergo bio-reduction to the more labile cobalt(II) species by ubiquitous one-electron reductases in cells. The original concept was that the cobalt(II) species would dissociate in hypoxic solid tumor cells to release a bioactive ligand [19]. Several families of cobalt(III) complexes with anticancer ligands such as hydroxamic acids [20] and nitrogen mustards [21] have been investigated as hypoxia-selective prodrug candidates.

In previous work we demonstrated that 2-acetylpyridine-*N*(4)-phenylthiosemicarbazone (HL1), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*para*-chlorophenylthiosemicarbazone (HL2), 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (HL3), and 2-acetylpyridine-*para*-chlorophenylhydrazone (HL4) were highly cytotoxic against human solid tumor

* Corresponding author.

E-mail addresses: hberaldo@ufmg.br, heloisaberaldoufmg@gmail.com (H. Beraldo).

cells [8,22]. In the present work, their cobalt(III) complexes were obtained (see Fig. 1) and the ability of the complexes to undergo reduction with subsequent release of the cytotoxic ligand was evaluated.

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and were used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A Quimis model Q405M conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR 1000 spectrometer using KBr pellets ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Thermogravimetric curves were obtained with a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the $25\text{--}750\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature range, under dynamic nitrogen atmosphere, at a heating rate of $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Magnetic susceptibility measurements were carried out at room temperature on a Johnson Matthey JM/AUTO balance (Alfa Aesar, serial number 13693). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Advance (200 MHz) spectrometer using $\text{DMSO-}d_6$ as the solvent and tetramethylsilane (Me_4Si) as internal reference. Electronic spectra were recorded on a Shimadzu UV-2401PC UV-Vis spectrophotometer using a 1 cm beam path quartz cuvette.

Electrochemical studies were performed on a $\mu\text{-AutoLab Type II}$ potentiostat, under nitrogen atmosphere at room temperature. The electrochemical cell employed a standard three electrode configuration: a glassy carbon working electrode, a platinum-wire auxiliary electrode and a Ag/AgCl electrode immersed in a salt bridge containing saturated LiCl in ethanol. Cyclic voltammograms were recorded in the 2.00 to -2.00 V potential range at 100 mV s^{-1} scan rate. The ferrocenium/ferrocene (Fc^+/Fc) couple ($0.400\text{ V versus NHE}$) was used as an internal standard. Solutions of compounds (0.5 mM) were prepared in acetonitrile containing $0.1\text{ M } ^t\text{Bu}_4\text{ClO}_4$. Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer – L1006m016 (Agilent Technologies), using a 1 cm quartz cell. Correction for the filter effect was performed. Mass spectra were recorded on a LCMS-IT-TOF (225-07100-34) liquid chromatograph mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source, operating in the negative and positive modes. The spectra were acquired by scanning over the $100\text{--}1000\text{ m/z}$ range.

Crystallographic analysis on a single-crystal of $[\text{Co}(\text{L}2)_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (**2a**) was carried out on a Bruker APEX II Duo diffractometer (Simon Fraser University, Burnaby, Canada) with graphite monochromated $\text{Cu K}\alpha$ radiation. A red block crystal was mounted on a MiteGen sample holder. The data were collected at 293 K to a maximum 2θ value of 145° . Data were collected in a series of ϕ and ω in 1.00° widths with $10.0\text{--}20.0\text{ s}$ exposures. The crystal-to-

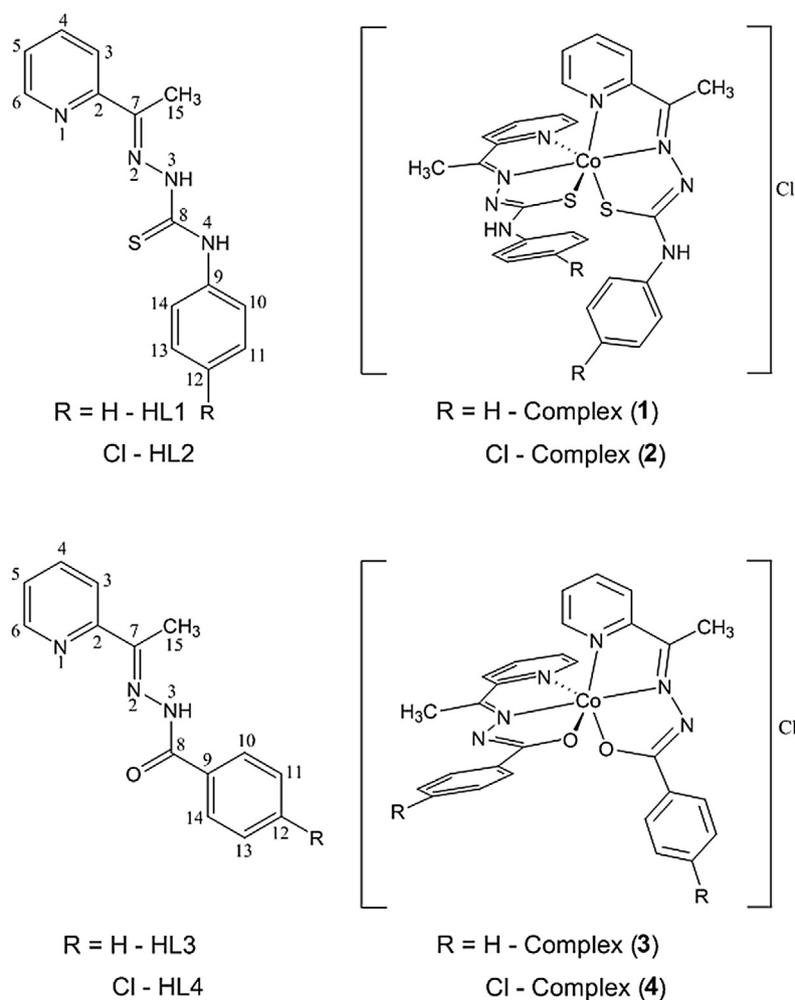


Fig. 1. Structural representations of 2-acetylpyridine-*N*(4)-phenylthiosemicarbazone (HL1), 2-acetylpyridine-*N*(4)-*para*-chlorophenylthiosemicarbazone (HL2), 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (HL3), 2-acetylpyridine-*para*-chlorophenylhydrazone (HL4) and their Co(III) complexes (1–4).

Table 1
Crystal data and structure refinement for [Co(L2)₂]Cl·CH₃OH (**2a**) and [Co(L3)₂]ClO₄·0.5H₂O·0.5DMSO (**3a**).

	2a	3a
Empirical formula	C ₂₉ H ₂₈ N ₈ S ₂ Cl ₃ OCo	C ₅₈ H ₅₆ Cl ₂ Co ₂ N ₁₂ O ₁₄ S
Formula weight (g mol ⁻¹)	733.99	1365.96
T (K)	293	190
λ (Å)	1.54178	0.71070
Crystal system, space group	monoclinic, P2 ₁ /n	monoclinic, P2 ₁ /n
Unit cell dimensions		
a (Å)	9.8288(2)	15.5298(6)
b (Å)	25.1779(4)	22.7645(6)
c (Å)	13.2495(2)	17.6442(6)
α (°)	90	90
β (°)	99.124(1)	107.315(4)
γ (°)	90	90
V (Å ³)	3237.4(10)	5955.0(4)
Z, Calculated density (mg m ⁻³)	4, 1.506	4, 1.524
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.80	0.76
F(000)	1504	2816
Theta range for data collection	3.5–68.6°	2.1–29.6°
Limiting indices	−11 ≤ h ≤ 11, −30 ≤ k ≤ 30, −15 ≤ l ≤ 15	−19 ≤ h ≤ 21, −30 ≤ k ≤ 27, −18 ≤ l ≤ 24
Reflections collected/unique [R _{int}]	54007/5951 [R _{int} = 0.091]	34592/14385 [R _{int} = 0.029]
Completeness	0.997 (θ = 29.45°)	0.999 (θ = 26.32°)
Absorption correction	Multi-scan (empirical)	Multi-scan (empirical)
Data/restraints/parameters	4507/0/411	11151/0/847
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Goodness-of-fit on F ²	1.02	1.03
Final R indices [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0410, wR ₂ = 0.0897	R ₁ = 0.042, wR ₂ = 0.110
R indices (all data)	R ₁ = 0.0628, wR ₂ = 0.1002	R ₁ = 0.0615, wR ₂ = 0.1103
Largest difference peak and hole (e Å ⁻³)	0.36 and −0.40	0.85 and −0.50

detector distance was 50 mm. The structure was solved by intrinsic phasing [23] and subsequent refinements were performed using *ShelXle* [24].

The complex crystallized with one molecule of CH₃OH solvent in the asymmetric unit. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. All C–H hydrogen atoms were placed in calculated positions but were not refined.

Crystallographic analysis on a single-crystal of [Co(L3)₂]ClO₄·0.5H₂O·0.5DMSO (**3a**) was carried out on an Oxford-Diffractometer GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG, Brazil) using a graphite-enhance source Mo Kα radiation (= 0.71070 Å) at 190 K. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the *CrysAlisPro* software package [25]. An absorption correction based on the multi-scan method was applied. The structures were solved by direct methods using *SHELXS-97* [26]. Full-matrix least-squares refinement procedure on F² with anisotropic thermal parameters was carried on using the *SHELX* package [27]. 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. Molecular graphics were prepared using *ORTEP* [28]. During the refinement, a disordered dimethylsulfoxide molecule was found and refined anisotropically. The introduction of the disordered model for this solvent molecule clearly improves the residual maps and the geometric bond parameters. The two neighbor sites for this solvent have occupancies of 0.7 and 0.3.

A summary of the crystal data, data collection details and refinement results for complexes (**2a**) and (**3a**) is listed in Table 1.

2.2. Syntheses of the Schiff base-derived ligands

The thiosemicarbazones and hydrazones were prepared as previously reported [29–31].

2.3. Syntheses of cobalt(III) complexes (1–4)

Cobalt(III) complexes (1–4) were prepared by stirring under reflux a methanol solution of the desired thiosemicarbazone or

hydrazone (2.0 mmol) with CoCl₂·6H₂O (1.0 mmol) for 3 h under oxygen supply. The obtained solids were washed with methanol followed by ethanol and diethyl ether and then dried *in vacuo*.

Crystals of [Co(L2)₂]Cl·CH₃OH (**2a**) were obtained upon recrystallization of complex (**2**) in CH₃OH solution.

Aiming to evaluate the influence of co-ligands on the electrochemical behavior of the cobalt(III) complexes and their ability to release the cytotoxic ligand, attempts to obtain complexes of the [Co(TPA)(L)]²⁺ type (TPA = tris(2-pyridylmethyl)amine; L = anionic thiosemicarbazone or hydrazone) were performed by reacting the desired ligand with [Co(TPA)Cl(H₂O)]·(ClO₄)₂·3.5H₂O in methanol. However, characterization of the products revealed the presence of [Co(L)₂]ClO₄ complexes. Recrystallization of the complex with HL3 in DMSO-*d*₆ gave rise to crystals of [Co(L3)₂]ClO₄·0.5H₂O·0.5DMSO (**3a**). Caution! Complexes containing perchlorate as counter-ion are explosive.

2.3.1. Bis(2-acetylpyridine-N(4)-phenylthiosemicarbazonato)cobalt(III) chloride, [Co(L1)₂]Cl·CH₃OH·0.5H₂O (**1**)

This complex has been published before by other authors [32]. It was obtained again in the present paper, in order for us to investigate its ability to release the thiosemicarbazone ligand upon reduction.

2.3.2. Bis(2-acetylpyridine-N(4)-para-chlorophenylthiosemicarbazonato)cobalt(III) chloride, [Co(L2)₂]Cl·1.5H₂O (**2**)

Brown solid. *Anal.* Calc. for C₂₈H₂₄Cl₃CoN₈S₂·1.5H₂O (FW = 728.99 g mol⁻¹): C, 46.13; H, 3.73; N, 15.37. Found: C, 46.16; H, 3.98; N, 15.28 %. Thermogravimetry: calculated weight loss of water (30–200 °C range): 7.41%. Found: 7.74%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ M, DMF): 55.72 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Decomposition: 264.2 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1552, ν(CS) 772, ρ(py) 654. δ ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 10.54 (s, 1H, N(4)H), 8.22–8.10 (m, 2H, H3 and H4), 8.02 (d, 1H, H6), 7.55–7.47 (m, 1H, H5), 3.00 (s, 3H, H15). δ ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 175.4 (C8), 159.6 (C2), 156.6 (C7), 149.4 (C6), 140.4 (C4), 127.7 (C5), 125.8 (C3), 15.9 (C15). Yield: 70%.

2.3.3. Bis(2-acetylpyridinephenylhydrazonato)cobalt(III) chloride, [Co(L3)₂]Cl·2H₂O (**3**)

Brown solid. *Anal. Calc.* for C₂₈H₂₄ClCoN₆O₂·2H₂O (FW = 606.95 g mol⁻¹): C, 55.41; H, 4.65; N, 13.85. Found: C, 55.63; H, 4.74; N, 14.01%. Thermogravimetry: calculated weight loss of water (30–200 °C range): 5.94%. Found: 5.66%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ M, DMF): 71.80 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 210–211 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1602 and 1498, ρ(py) 662. δ ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 8.24–8.22 (m, 2H, H3 and H4), 7.99–7.94 (m, 1H, H6), 7.57–7.47 (m, 1H, H5), 3.36 (s, 3H, H15). δ ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 181.2 (C8), 160.1 (C2), 162.2 (C7), 152.1 (C6), 141.9 (C4), 129.9 (C5), 126.2 (C3), 15.0 (C15). Yield: 33%.

2.3.4. Bis(2-acetylpyridine-*para*-chlorophenylhydrazonato)cobalt(III) chloride, [Co(L4)₂]Cl·3.5H₂O (**4**)

Brown solid. *Anal. Calc.* for C₂₈H₂₂Cl₃CoN₆O₂·3.5H₂O (FW = 702.86 g mol⁻¹): C, 47.85; H, 4.16; N, 11.96. Found: C, 47.95; H, 4.51; N, 12.05%. Thermogravimetry: calculated weight loss of water (30–200 °C range): 8.97%. Found: 9.44%. Molar conductivity (1 × 10⁻³ M, DMF): 65.33 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 218–219 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(CN) 1602 and 1498, ρ(py) 662. δ ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 8.25–8.23 (m, 2H, H3 and H4), 7.99–7.94 (m, 1H, H6), 7.57–7.51 (m, 1H, H5), 3.34 (s, 3H, H15). δ ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 180.1 (C8), 160.0 (C2), 163.0 (C7), 152.2 (C6), 142.0 (C4), 129.0 (C5), 126.5 (C3), 15.1 (C15). Yield: 43%.

2.4. Studies on the interactions of complexes (**1**) and (**3**) with sodium dithionite reducing agent

Reduction of the complexes in the presence of sodium dithionite (Na₂S₂O₄, DTN) was monitored by electronic spectroscopy. Solutions of complexes (**1**) and (**3**) (2.5 × 10⁻⁵ M) in Tris–HCl buffer (NaCl 50 mM, Tris–HCl 5 mM, pH 7.2) 5% DMSO in the presence of 10 or 3 equivalents of DTN were prepared and used to record the electronic spectra as a function of time.

Reduction of complex (**3**) in the presence of DTN was also monitored by mass spectrometry. Mass spectra of complex (**3**) and of the ligand HL3 (2.5 × 10⁻⁵ M) in Tris–HCl buffer 5% DMSO were recorded. Then, solutions of complex (**3**) in Tris–HCl buffer 5% DMSO containing 3 or 10 equivalents of DTN were monitored as a function of time (t = 10 min, t = 1 h and t = 2 h) by mass spectroscopy.

2.5. Studies on the interaction of complexes (**1–4**) with human serum albumin (HSA)

The interaction of complexes (**1–4**) with human serum albumin (HSA) was studied in buffer (5 mM Tris–HCl/50 mM NaCl) at pH 7.4. A stock solution of HSA was prepared in Tris–HCl buffer and stored in the dark in the refrigerator for further use. The HSA concentration (2 μM) was determined by the UV absorbance at 280 nm (ε = 35,353 L mol⁻¹ cm⁻¹). The stock solutions of complexes (**1–4**) (0.5 mM) were freshly prepared by first dissolving the compounds in DMSO and then making the dilutions with Tris–HCl buffer. The amount of DMSO was kept less than 5% (by volume) for each set of experiments and had no effect on any experimental results.

The binding of the complexes to HSA was studied using fluorescence spectroscopy. The emission spectra were recorded in the 310–600 nm range with excitation at 295 nm. HSA solution was titrated by successive additions of a stock solution of the complexes using a micropipette. All experiments were performed at 298 K.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the cobalt(III) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of [Co(L1)₂]Cl·CH₃OH·0.5H₂O (**1**), [Co(L2)₂]Cl·1.5H₂O (**2**), [Co(L3)₂]Cl·2H₂O (**3**) and [Co(L4)₂]Cl·3.5H₂O (**4**).

In complexes (**1–4**) two anionic ligands are attached to the metal center and a chloride acts as the counter-ion. The presence of crystallization water molecules in all complexes and of a crystallization methanol molecule in complex (**1**) were confirmed by the thermogravimetric curves of the complexes, which showed weight losses of 5.84% (calcd. 6.09% corresponding to CH₃OH + 0.5 H₂O) (**1**), 7.74% (calcd. 7.41%) (**2**), 5.66% (calcd. 5.94%) (**3**) and 9.44% (calcd. 8.97%) (**4**). All complexes showed magnetic moment values close to 0 BM, indicating the presence of low spin Co(III).

3.2. Spectroscopic characterization

In the infrared spectra of complexes (**1–4**), a broad absorption at 3408–3390 cm⁻¹ was assigned to the ν(O–H) vibration of water [33]. The vibrations attributed to ν(N3–H) at 3300–3181 cm⁻¹ in the spectra of the free ligands disappear in the spectra of complexes (**1–4**) in agreement with deprotonation at N3 [34–36]. The ν(C=N) absorption observed in the 1606–1582 cm⁻¹ range in the spectra of the ligands shifts to 1602–1552 cm⁻¹ in the spectra of the complexes, in accordance with coordination of the azomethine nitrogen [8,35,37,38]. The ν(C=S) absorption which is found at 800 and 802 cm⁻¹ in the infrared spectra of the uncomplexed thiosemicarbazones (HL1 and HL2) shifts to 756 and 772 cm⁻¹ in the spectra of **1** and **2**, respectively, suggesting coordination of the sulfur. The 44–30 cm⁻¹ shift is compatible with complexation of a thiolate sulfur [6,39]. The absorptions attributed to ν(C=O) at 1655 and 1659 cm⁻¹ in the spectra of the free hydrazones (HL3 and HL4) disappear in those of complexes (**3–4**), indicating coordination of the enolate oxygen [8,40]. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 623–620 cm⁻¹ in the spectra of the ligands shifts to 662–654 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1–4**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [34,35,39,41].

The NMR spectra of the ligands and their cobalt(III) complexes were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC) (see Fig. 1).

The signals of the hydrogens are duplicated in the ¹H NMR spectra of HL1–HL3, indicating the presence of the *E* and *Z* configurational isomers in the DMSO-*d*₆ solution (Fig. 2). In the first, N(3)–H is hydrogen bonded to the solvent, while in the second N(3)–H is hydrogen bonded to the hetero-aromatic nitrogen [8,42]. The signals of N(3)–H were observed at 10.68 (95%) and 10.82 (94%) (*E* isomer) and at 14.44 (5%) and 14.65 (6%) (*Z* isomer) in the spectra of HL1 and HL2, respectively, while in the spectrum of HL3 these signals were found at 10.93 (*E* isomer, 99%) and at 15.83 (*Z* isomer, 1%). Only one signal was found in the spectrum of HL4 at 11.00 (*E* isomer). In the ¹³C NMR spectrum of HL3 the signals of the carbons are also duplicated. Duplicated signals were not observed in the ¹³C NMR spectra of the other ligands due to their low solubility.

Only one signal was observed for all hydrogens and carbons in the NMR spectra of complexes (**1–4**). The signals of N(3)–H were absent in the spectra of the complexes, in agreement with deprotonation upon coordination. In addition, the signals of all hydrogens

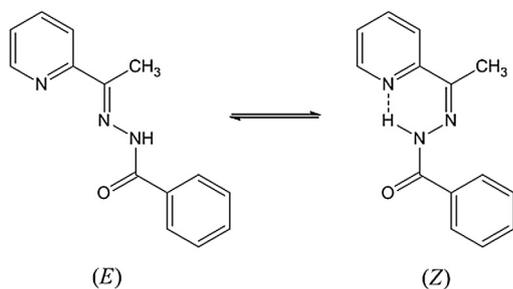


Fig. 2. Structural representations of 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (HL3) (*E* and *Z*) configurational isomers.

undergo significant shifts in relation to their positions in the free ligands. Similarly, variations occur in the signals of the pyridine carbons, C=N and C=S or C=O, in accordance with coordination through the N_{py} -N-S chelating system for the thiosemicarbazone ligands or through the N_{py} -N-O chelating system for the hydrazone ligands [8,34,39,41]. Thus, in complexes (1–4) the ligands

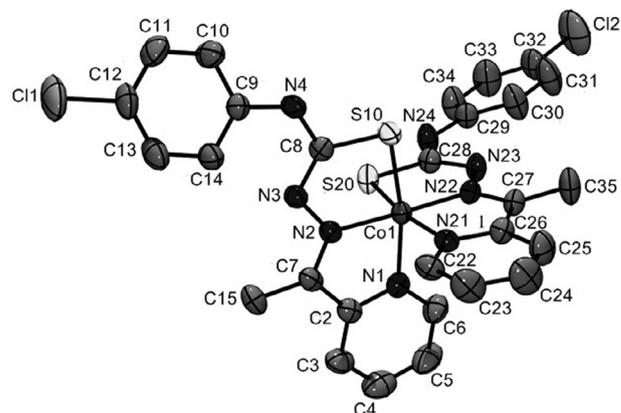


Fig. 3. ORTEP plot of complex (**2a**) (50% probability) using POV-ray, showing the labelling scheme, excluding hydrogen atoms and solvent. The Cl counter-ion is also omitted.

adopt the *E* configuration in relation to the C(7)–N(2) bond, as confirmed by the crystal structures of **2a** and **3a**.

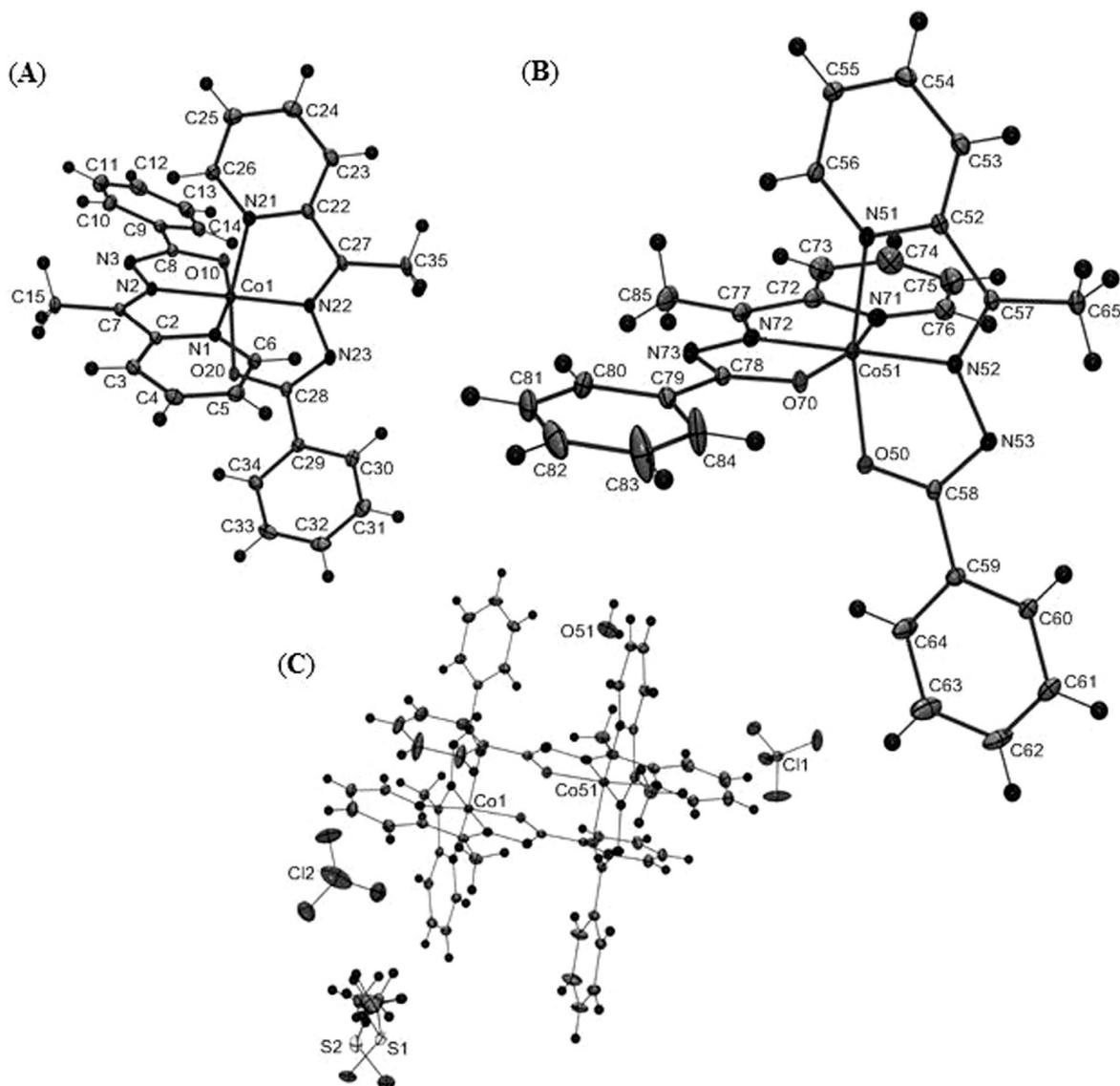


Fig. 4. ORTEP drawings of (A) molecule [1], (B) molecule [2], and (C) the asymmetric unit of $[Co(L3)_2]ClO_4 \cdot 0.5H_2O \cdot 0.5DMSO$ (**3a**), with displacement ellipsoids at the 20% probability level.

3.3. X-ray crystallography

Crystal data, data collection details and refinement results for complexes (**2a**) and (**3a**) are listed in Table 1. The crystal structure of HL2 had been previously determined by our group [43] and the crystal structure of HL3 had been previously determined by other authors [44].

Compound (**2a**) (Fig. 3) crystallizes in the centrosymmetric group $P2_1/n$ with a single molecule of **2a** in the asymmetric unit, along with one MeOH crystallization molecule. The MeOH solvent molecule forms a hydrogen bonding interaction between the MeOH oxygen and the hydrogen atom on N(4) (1.970 Å). The Co center is in a distorted octahedral environment, as evidenced by the near 90 degree angles to the two ligands.

Complex (**3a**) crystallizes in the centrosymmetric group $P2_1/n$, with two $[\text{Co}(\text{L}3)_2]\text{ClO}_4$ species in the asymmetric unit. The asymmetric unit of the crystal shows, in addition, one water molecule and one disordered dimethylsulfoxide (Fig. 4). The metal presents octahedral coordination in both $[\text{Co}(\text{L}3)_2]^+$ complexes, with Co bond angles varying from 82° to 98° either in Co(1) and in Co(51).

Despite the similar octahedral coordination, the L3 ligands in the two $[\text{Co}(\text{L}3)_2]$ molecules are slightly different. For molecule [1], containing Co(1), the two L3 ligands are almost planar, with the angle between the least-squares planes through the phenyl ring and the hydrazone scaffold equal to $3.42(4)^\circ$ and $5.39(9)^\circ$. For molecule [2], containing Co(51), on the other hand, the phenyl rings and the hydrazone framework are not in the same plane, with angles between the least-squares planes being equal to $18.93(7)^\circ$ and $9.93(5)^\circ$. This is related to the presence of two crystallograph-

ically independent $[\text{Co}(\text{L}3)_2]\text{ClO}_4$ complexes in the asymmetric unit of the crystal (Fig. 4C).

Table 2 presents selected intramolecular bond distances and angles for **2a** and **3a**. Data for molecule [2] of complex (**3a**) were omitted to simplify the presentation. The complete data are available on Supplementary material.

The N(1)–Co(1)–S(10) [$168.74(8)^\circ$] and N(1)–Co(1)–O(10) [$164.67(7)^\circ$] angles of complexes (**2a**) and (**3a**), respectively, deviate from the ideal value of 180° , probably due to the spatial requirements of the ligand chelating system. The expected lengthening of the C(8)–S(10) bond from 1.671(2) Å in HL2 to 1.739(3) Å in **2a** and of the C(8)–O(10) bond from 1.219(2) Å in HL3 to 1.299(2) Å in **3a**, together with the shortening of the N(3)–C(8) bond from 1.352(2) Å in HL2 to 1.309(4) Å in **2a**, and from 1.347(3) Å in HL3 to 1.325(3) Å in **3a** were observed (Table 2). This occurs because the C(8)–O(10) and C(8)–S(10) bonds change from a double to a predominantly single bond whereas N(3)–C(8) acquires some double bond character due to deprotonation at N(3) and formation of a highly delocalized system. The bond distances between the cobalt center and the imine nitrogen (1.882(2) Å in **2a** and 1.8542(16) Å in **3a**) are slightly shorter than the bond distances between the cobalt center and the hetero-aromatic nitrogen (1.950(2) Å in **2a** and 1.9183(18) Å in **3a**).

3.4. Electrochemical studies

Since hypoxia-activated prodrugs commonly present a reduction potential in the -0.1 to -0.5 V versus NHE range for activation by cellular reductants [18], the electrochemical behavior of the

Table 2

Selected bond distances (Å) and angles ($^\circ$) for $[\text{Co}(\text{L}2)_2]\text{Cl}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (**2a**) and $[\text{Co}(\text{L}3)_2]\text{ClO}_4\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}\cdot 0.5\text{DMSO}$ (**3a**).

	HL2 [43]	(2a)	HL3 [44]	(3a)
C(7)–N(2)/C(27)–N(22)	1.283(2)	1.300(4)/1.303(4)	1.264(3)	1.292(3)/1.291(3)
N(2)–N(3)/N(22)–N(23)	1.374(2)	1.380(3)/1.377(3)	1.375(2)	1.369(2)/1.371(2)
N(3)–C(8)/N(23)–C(28)	1.352(2)	1.309(4)/1.322(4)	1.347(3)	1.325(3)/1.319(3)
C(8)–O(10)/C(28)–O(20)	–	–	1.219(2)	1.299(2)/1.299(2)
C(8)–S(10)/C(28)–S(20)	1.671(2)	1.739(3)/1.737(3)	–	–
Co(1)–N(1)/Co(1)–N(21)	–	1.950(2)/1.962(3)	–	1.9183(18)/1.9264(18)
Co(1)–N(2)/Co(1)–N(22)	–	1.882(2)/1.883(2)	–	1.8542(16)/1.8541(16)
Co(1)–O(10)/Co(1)–O(20)	–	–	–	1.8995(15)/1.9025(15)
Co(1)–S(10)/Co(1)–S(20)	–	2.2104(9)/2.2102(10)	–	–
C(2)–C(7)–N(2)/C(22)–C(27)–N(22)	–	113.0(3)/113.3(3)	114.47(15)	111.41(18)/111.64(18)
C(7)–N(2)–N(3)/C(27)–N(22)–N(23)	118.86(15)	118.7(2)/119.2(2)	119.02(14)	123.15(17)/123.39(17)
N(2)–N(3)–C(8)/N(22)–N(23)–C(28)	118.66(15)	111.1(2)/111.4(2)	117.02(13)	106.83(16)/107.17(16)
N(3)–C(8)–O(10)/N(23)–C(28)–O(20)	–	–	123.32(15)	124.2(2)/124.4(2)
N(3)–C(8)–S(10)/N(23)–C(28)–S(20)	119.99(15)	125.1(2)/124.6(2)	–	–
N(1)–Co(1)–N(21)	–	90.93(10)	–	92.13(7)
N(1)–Co(1)–N(22)	–	98.14(10)	–	97.82(7)
N(1)–Co(1)–O(10)/N(21)–Co(1)–O(20)	–	–	–	164.67(7)/164.66(7)
N(1)–Co(1)–S(10)/N(21)–Co(1)–S(20)	–	168.74(8)/169.03(8)	–	–
N(2)–Co(1)–O(20)	–	–	–	96.74(7)
O(10)–Co(1)–O(20)	–	–	–	90.23(7)
O(10)–Co(1)–N(21)	–	–	–	91.62(7)
O(10)–Co(1)–N(22)	–	–	–	97.41(7)
N(2)–Co(1)–S(20)	–	91.53(8)	–	–
S(10)–Co(1)–S(20)	–	91.49(4)	–	–
S(10)–Co(1)–N(21)	–	90.00(7)	–	–
S(10)–Co(1)–N(22)	–	93.10(8)	–	–

Table 3

Redox potential values (V vs. NHE) for the redox couples $\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}$ and $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{I}}$ of complexes (**1–4**) (0.5 mM complex, 0.1 M $^n\text{Bu}_4\text{ClO}_4$, scan rate 100 mV s^{-1} , CH_3CN , 298 K).

	$E_{\text{pc}}(\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}})$	$E_{\text{pa}}(\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^{\text{III}})$	$E_{1/2}$	$E_{\text{pc}}(\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^{\text{I}})$	$E_{\text{pa}}(\text{Co}^{\text{I}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}})$	$E_{1/2}$
1	–0.73	–0.65	–0.70	–1.52	–1.41	–1.46
2	–0.70	–0.65	–0.68	–1.37	–1.30	–1.34
3	–0.32	–0.26	–0.29	–1.45	–1.40	–1.42
4	–0.28	–0.22	–0.25	–1.43	–1.37	–1.40

* Ref. [32].

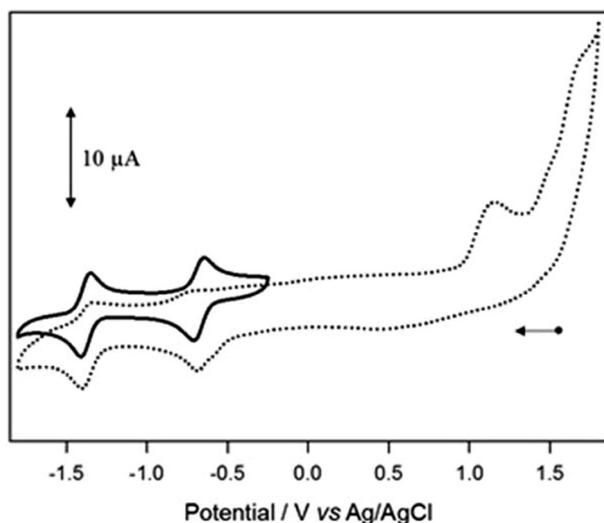


Fig. 5. Cyclic voltammograms of complex (2) at 100 mV s^{-1} scan rate in acetonitrile at 298 K. Dotted line: +1.8 to -1.8 V , solid line: -0.25 to -1.8 V scan ranges.

cobalt(III) complexes was investigated. The reduction potentials (Table 3) and reversibility for complexes (2–4) were determined using cyclic voltammetry. The electrochemical behavior of complex (1) was previously published [32].

One irreversible process around 1.2 V was detected in the cyclic voltammograms of 2–4, which was assigned to an oxidation process involving the thiosemicarbazone [32,45] or the hydrazone [46,47] portions of the ligand. Two well-defined quasi-reversible processes were also observed, which were attributed to the $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ and $\text{Co}^{\text{I}}/\text{Co}^{\text{II}}$ redox couples (see Fig. 5). In the first case, the processes were observed at $E_{1/2} = -0.68 \text{ V}$ (2), -0.29 V (3), and -0.25 V (4) versus NHE, while in the second the processes were identified at $E_{1/2} = -1.34 \text{ V}$ (2), -1.42 V (3), and -1.40 V (4) versus NHE. For complex (1) the reported values are $E_{1/2} = -0.70 \text{ V}$ and $E_{1/2} = -1.46 \text{ V}$ for the $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ and $\text{Co}^{\text{I}}/\text{Co}^{\text{II}}$ processes, respectively [32], which are similar to the potential values obtained in the present work for complex (2). Hence, the foregoing results indicate that coordination of cobalt to the hydrazone ligands in complexes (3) and (4) better stabilizes the Co^{II} oxidation state in comparison

to the thiosemicarbazone ligands in 1 and 2. Thus, the electrochemical studies suggested that complexes (3) and (4) could, in principle, be more easily reduced with release of the cytotoxic ligand.

3.5. Studies on the interactions of complexes (1) and (3) with sodium dithionite reducing agent

Stability studies of the complexes were performed in buffered solution (5% DMSO/Tris-HCl, $\text{pH} = 7.2$) under an oxygen atmosphere. The electronic spectra of the compounds did not undergo substantial variations with time, indicating that decomplexation did not occur under the experimental conditions.

In order to simulate the bioreduction of the complexes, reactions of 1 and 3 with sodium dithionite were carried out and spectrophotometrically monitored. The electronic spectrum of complex (1) in the absence of the reducing agent showed an intraligand transition at 254 nm ($\epsilon = 45,624 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and one ligand-to-metal charge transfer (LMCT) transition at 372 nm ($\epsilon = 27,660 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). In turn, the spectrum of 3 presented an intraligand transition at 282 nm ($\epsilon = 28,460 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and two LMCT transition bands at 372 ($\epsilon = 18,828 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 387 nm ($\epsilon = 18,152 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, DTN) shows an intense absorption at 315 nm ($\epsilon = 8043 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Upon addition of up to 10 equivalents of DTN, the LMCT transition of complex (1) is still observable over 24 h (Fig. 6A). In contrast, when the same excess of the reducing agent was added to a solution of complex (3), the LMCT bands disappeared immediately, suggesting fast reduction of cobalt(III). Reduction of complex (3) was also monitored in the presence of 3 equivalents of DTN (Fig. 6B) and the electronic spectra were obtained as a function of time over 1 h. A decrease in the LMCT bands was observed, suggesting reduction with possible release of the hydrazone ligand.

In order to verify if reduction of complex (3) by DTN was accompanied by ligand release, the process was followed by mass spectrometry. The mass spectrum of 2-acetylpyridine-phenylhydrazone (HL3) shows a peak at m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 262 whereas the spectrum of complex (3) shows a peak at m/z $[\text{M}]^+$ 535. In the absence of DTN the mass spectrum of complex (3) does not show the signal of the ligand. In the presence of 3 equivalents of DTN the peak of the intact complex at m/z $[\text{M}]^+$ 535 and the peak of the free ligand

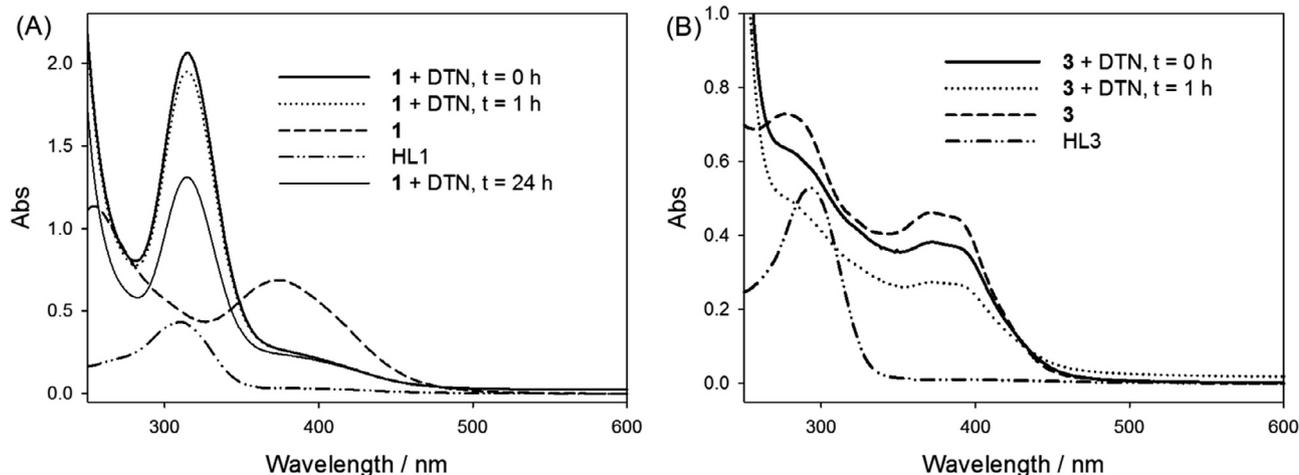


Fig. 6. UV-Vis spectra of (A) complex (1) in the presence of 10 equivalents of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (DTN), (B) complex (3) in the presence of 3 equivalents of DTN. Solutions of 1 and 3 ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) in Tris-HCl buffer ($\text{pH} 7.2$) 5% DMSO containing 3 or 10 equivalents of DTN were employed. The UV-Vis spectra of the ligands (HL1 and HL3) and complexes (1 and 3) in the absence of DTN were obtained at the same conditions. In (A) the absorption at 315 nm ($\epsilon = 8,043 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) is attributed to DTN.

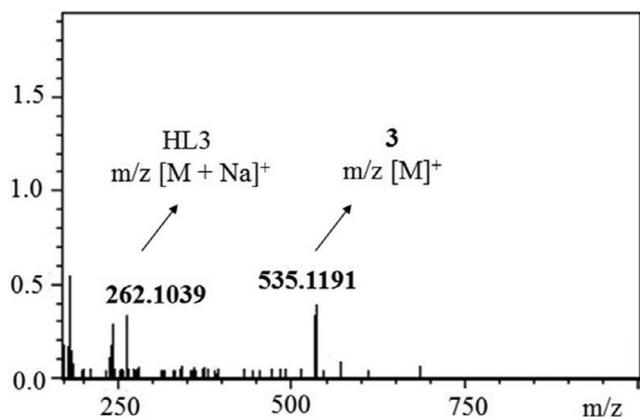


Fig. 7. Mass spectrum of complex (**3**) (2.5×10^{-5} M) in Tris-HCl buffer (pH 7.2) 5% DMSO in the presence of 3 equivalents of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (DTN), $t = 1$ h.

at m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 262 were observed, indicating that complex (**3**) can be reduced by DTN with subsequent ligand release (Fig. 7). However, even after 60 min the signal of the complex was still noticeable, suggesting that decomplexation was not complete. The same effect was observed in the presence of 10 equivalents of DTN. This is possibly due to decomposition of sodium dithionite in aqueous solution as a function of time.

The studies of reduction with DTN are in agreement with the electrochemical data, which showed that the cobalt(III) complexes

with hydrazones (**3** and **4**) are more easily reduced than complexes (**1**) and (**2**) containing thiosemicarbazone ligands. Hence, complex (**4**) should, in principle, also be able to release the ligand upon reduction with DTN.

3.6. Studies on the interaction of complexes (**1–4**) with human serum albumin (HSA)

When excited at 295 nm, HSA shows intrinsic fluorescence due to the tryptophan residue (Trp-214). Hence, quenching of HSA fluorescence was used to investigate the interaction between HSA and complexes (**1–4**) [48,49]. Fig. 8 shows the effect of increasing the concentration of **3** on the fluorescence emission of HSA. Quenching of fluorescence emission at 340 nm suggests the formation of a HSA-complex system and alteration of the local microenvironment around the Trp-214 residue in HSA. A similar effect was observed for **1**, **2** and **4**.

Based on fluorescence data for $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm at 25 °C, the Stern-Volmer quenching constant (K_{sv}) and the bimolecular quenching rate constant (K_{q}) were obtained using the classical Stern-Volmer equation [Eq. (1)] [50,51].

$$F_0/F = 1 + K_{\text{q}}\tau_0[\text{Q}] = 1 + K_{\text{sv}}[\text{Q}] \quad (1)$$

in which F_0 is the fluorescence intensity in the absence of quencher, F is the fluorescence intensity in the presence of quencher, τ_0 is the average lifetime of the fluorophore in absence of quencher ($\tau_0 = 2.7$ ns for Trp-214) and $[\text{Q}]$ is the quencher concentration. K_{sv}

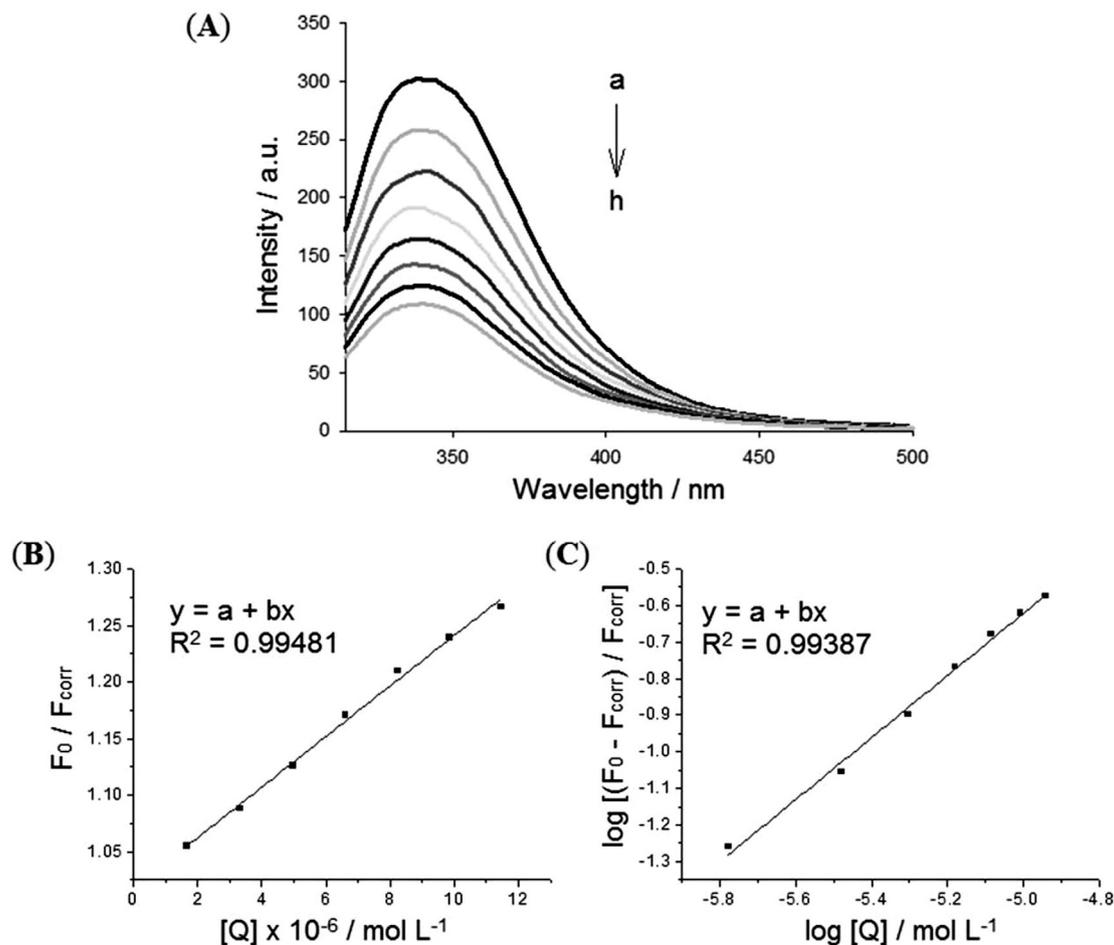


Fig. 8. (A) Fluorescence emission spectra excited at 295 nm for HSA-**3** system (Tris-HCl buffer, pH 7.4, $T = 298$ K); (a) 2.0 μM of HSA; (b-h) 2.0 μM of HSA in the presence of 1.67, 3.33, 4.98, 6.61, 8.24, 9.85, and 11.5 μM of **3**. (B) Plot of F_0/F_{corr} vs. $[\text{Q}]$, ($\lambda_{\text{em}} = 340$ nm); (C) Plot of $\log [(F_0 - F_{\text{corr}})/F_{\text{corr}}]$ vs. $\log [\text{Q}]$ ($\lambda_{\text{em}} = 340$ nm).

is the slope, obtained from the linear fit from the plot of F_0/F versus $[Q]$, and K_q is calculated as the K_{sv}/τ_0 ratio.

The inner filter effect may decrease the intensity of the excitation at the point of observation, or decrease the observed fluorescence by absorption of the fluorescence. This process depends upon the optical densities of the sample at the excitation and emission wavelengths [50]. The effect of optical density on fluorescence intensity can be corrected using Eq. (2).

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})/2} \quad (2)$$

where F_{obs} is the observed fluorescence at 340 nm, OD_{ex} and OD_{em} are the optical densities at the excitation (295 nm) and emission (340 nm) wavelengths, respectively.

Hence, the Stern–Volmer equation was modified to:

$$F_0/F_{\text{corr}} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

The determined K_{sv} values for HSA-1, HSA-2, HSA-3 and HSA-4 systems were $(1.89 \pm 0.02) \times 10^4$, $(3.82 \pm 0.01) \times 10^4$, $(2.23 \pm 0.03) \times 10^4$ and $(3.40 \pm 0.03) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively. The calculated values of K_q for the HSA-complex systems are in the order of $10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ which is higher than $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, the maximum scatter collision quenching constant of quenchers with HSA [50]. Hence, it may be suggested that the quenching mechanism was not originated from dynamic collision but it might have been caused by a specific interaction between HSA and the complexes, a static quenching mechanism.

The values of the binding constant (K) and number of binding sites (n) were calculated using the modified Scatchard equation [Eq. (4)] [52]:

$$\log[(F_0 - F_{\text{corr}})/F_{\text{corr}}] = \log K + n \log [Q] \quad (4)$$

where K is the antilog of the intercept and n is the slope obtained from the plot of $\log[(F_0 - F_{\text{corr}})/F_{\text{corr}}]$ versus $\log [Q]$.

The obtained binding constants (K) and number of binding sites (n) were $[K = 6.61 \times 10^2 \text{ M}^{-1}, n = 0.68 \pm 0.04]$ (HSA-1), $[K = 9.50 \times 10^3 \text{ M}^{-1}, n = 0.88 \pm 0.03]$ (HSA-2), $[K = 4.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}, n = 0.85 \pm 0.03]$ (HSA-3) and $[K = 6.77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}, n = 1.06 \pm 0.05]$ (HSA-4). The K values indicate interaction between the complexes and HSA, suggesting that they could be transported by serum albumin proteins.

4. Conclusions

The foregoing results indicated that coordination of 2-acetylpyridine-derived hydrazones with cytotoxic activity to cobalt(III) results in compounds which are able to release the bioactive ligand upon reduction and encourage future studies on the cytotoxic effects of complexes (3) and (4) under normoxia and hypoxia conditions.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, CAPES, INCT-INOVAR (Proc. CNPq573.364/2008-6) (Brazil) and ELAP (Emerging leaders in the Americas Program, Canada). The Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada) is thanked for a Discovery Grant (T.S.), and a postgraduate fellowship (R.M.C.).

Appendix A. Supplementary data

CCDC 1491217 and 1491764 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail:

deposit@ccdc.cam.ac.uk. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.12.024>.

References

- [1] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31, <http://dx.doi.org/10.2174/1389557043487484>.
- [2] P. Kumar, B. Narasimhan, *Mini-Rev. Med. Chem.* 13 (2013) 971, <http://dx.doi.org/10.2174/1389557511313070003>.
- [3] S. Rollas, S.G. Küçükgülzel, *Molecules* 12 (2007) 1910, <http://dx.doi.org/10.3390/12081910>.
- [4] T.S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 977, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.004>.
- [5] S. Indoria, T.S. Lobana, H. Sood, D.S. Arora, G. Hundal, J.P. Jasinski, *New J. Chem.* 40 (2016) 3642, <http://dx.doi.org/10.1039/C5NJ02822A>.
- [6] K.S.O. Ferraz, J.G. Da Silva, F.M. Costa, B.M. Mendes, B.L. Rodrigues, R.G. dos Santos, H. Beraldo, *Biomaterials* 26 (2013) 677, <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-013-9639-x>.
- [7] G.L. Parrilha, K.S.O. Ferraz, J.A. Lessa, K.N. de Oliveira, B.L. Rodrigues, J.P. Ramos, E.M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 537, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.055>.
- [8] A.A.R. Despaigne, G.L. Parrilha, J.B. Izidoro, P.R. da Costa, R.G. dos Santos, O.E. Piro, E.E. Castellano, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 50 (2012) 163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.051>.
- [9] I.P. Ferreira, E.D.L. Piló, A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, J.P. Ramos, L.B. Marques, P.H.D.M. Prazeres, J.A. Takahashi, E.M. Souza-Fagundes, W. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 2988, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.007>.
- [10] C.V. Garcia, G.L. Parrilha, B.L. Rodrigues, S.F. Teixeira, R.A. de Azevedo, A.K. Ferreira, H. Beraldo, *New J. Chem.* 40 (2016) 7379, <http://dx.doi.org/10.1039/C6NJ00050A>.
- [11] I.H. Hall, C.B. Lackey, T.D. Kistler, R.W. Durham, E.M. Jouad, M. Khan, X.D. Thanh, S. Djebbar-Sid, O. Benali-Baitich, G.M. Bouet, *Pharmazie* 55 (2000) 937.
- [12] R. Manikandan, P. Vijayan, P. Anitha, G. Prakash, P. Viswanathamurthi, R.J. Butcher, K. Velmurugan, R. Nandhakumar, *Inorg. Chim. Acta* 421 (2014) 80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jica.2014.05.035>.
- [13] M.D. Hall, T.W. Failes, N. Yamamoto, T.W. Hambley, *Dalton Trans.* (2007) 3983, <http://dx.doi.org/10.1039/B707121C>.
- [14] T.W. Failes, C. Cullinane, C.I. Diakos, N. Yamamoto, J.G. Lyons, T.W. Hambley, *Chem. Eur. J.* 13 (2007) 2974, <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200601137>.
- [15] N. Yamamoto, A.K. Renfrew, B.J. Kim, N.S. Bryce, T.W. Hambley, *J. Med. Chem.* 55 (1021) (2012) 11013, <http://dx.doi.org/10.1021/jm3014713>.
- [16] A.K. Renfrew, N.S. Bryce, T.W. Hambley, *Chem. Sci.* 4 (2013) 3731, <http://dx.doi.org/10.1039/C3SC51530C>.
- [17] A.K. Renfrew, N.S. Bryce, T. Hambley, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 15224, <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201502702>.
- [18] B.J. Kim, T.W. Hambley, N.S. Bryce, *Chem. Sci.* 2 (2011) 2135, <http://dx.doi.org/10.1039/C1SC00337B>.
- [19] J.Y. Chang, G. Lu, R.J. Stevenson, P.J. Brothers, G.R. Clark, K.J. Botting, D.M. Ferry, M. Tercel, W.R. Wilson, W.A. Denny, D.C. Ware, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 7688, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic4006967>.
- [20] T.W. Failes, T.W. Hambley, *Dalton Trans.* (2006) 1895, <http://dx.doi.org/10.1039/b512322d>.
- [21] D.C. Ware, B.D. Palmer, W.R. Wilson, W.A. Denny, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1839, <http://dx.doi.org/10.1021/jm00065a006>.
- [22] M.A. Soares, J.A. Lessa, I.C. Mendes, J.G. da Silva, R.G. dos Santos, L.B. Salum, H. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, J.L. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 3396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027>.
- [23] G.M. Sheldrick, *SHELXT v2014*, Bruker AXS Inc: Madison, WI.
- [24] C.B. Hubschle, G.M. Sheldrick, B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.* 44 (2011) 1281, <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889811043202>.
- [25] Oxford Diffraction, *CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21* (release 20–01–2012 CrysAlis171.NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England (2010).
- [26] G.M. Sheldrick, *SHELXS-2013/1: Program for Crystal Structure Solution*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2013.
- [27] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. C* 71 (2015) 3, <http://dx.doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [28] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849, <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889812029111>.
- [29] D.L. Klayman, J.F. Bartosevich, T.S. Griffin, C.J. Mason, J.P. Scovill, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 855, <http://dx.doi.org/10.1021/jm00193a020>.
- [30] D.X. West, N.M. Kozub, G.A. Bain, *Transit. Met. Chem.* 21 (1996) 52, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00166013>.
- [31] S. Choudhary, J.R. Morrow, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 4096, [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20021104\)41:21***4096::AID-ANIE4096***3.0.CO;2-O](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20021104)41:21***4096::AID-ANIE4096***3.0.CO;2-O).
- [32] C.G. Oliveira, P.I.S. Maia, M. Miyata, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, E.T. De Almeida, V. M. Deflon, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 1848, <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140149>.
- [33] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, fourthed., Brooks/Cole, United States of America, 656p, 2009.

- [34] A.A.R. Despaigne, L.F. Vieira, I.C. Mendes, F.B. da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000700012>.
- [35] 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.040>.
- [36] 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.11.035>.
- [37] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, A.C.M. do Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 2117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2008.09.040>.
- [38] D.G.J. Batista, P.B. da Silva, D.R. Lachter, R.S. Silva, R.Q. Aucelio, S.R.W. Louro, H. Beraldo, M.N.C. Soeiro, L.R. Teixeira, *Polyhedron* 29 (2010) 2232, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2010.04.023>.
- [39] J.F. da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2009.04.022>.
- [40] 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2011.04.024>.
- [41] 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.11.022>.
- [42] L.B.P. Sâmia, G.L. Parrilha, J.G. Da Silva, J.P. Ramos, E.M. Souza-Fagundes, S. Castelli, V. Vutey, A. Desideri, H. Beraldo, *Biometals* 29 (2016) 515, <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-016-9933-5>.
- [43] 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.021>.
- [44] J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D.N. Deobagkar, C.E. Anson, A. Powell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 51, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00855-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00855-7).
- [45] M.V. Rodić, V.M. Leovac, L.S. Jovanović, L.S. Vojinović-Ješić, V. Divjaković, V.I. Češljević, *Polyhedron* 46 (2012) 124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2012.08.011>.
- [46] I.G. Belaya, S.V. Svidlov, A.V. Dolganov, G.E. Zelinskii, T.V. Potapova, A.V. Vologzhanina, O.A. Varzatskii, Y.N. Bubnov, Y.Z. Voloshin, *Dalton Trans.* 42 (2013) 13667, <http://dx.doi.org/10.1039/C3DT50881A>.
- [47] M. Bakir, O. Green, *J. Mol. Struct.* 996 (2011) 24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2013.01.013>.
- [48] S. Tabassum, W.M. Al-Asbahy, M. Afzal, F. Arjmand, J. Photochem. Photobiol. B 114 (2012) 132, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.05.021>.
- [49] A. Ray, B.K. Seth, U. Pal, S. Basu, *Spectrochim. Acta A* 92 (2012) 164, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.060>.
- [50] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3rd ed., University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, 2006, p. 954.
- [51] N. Shahabadi, M. Mohammadpour, *Spectrochim. Acta A* 86 (2012) 191, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2011.10.023>.
- [52] P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A.H. Cowley, R.R. Butorac, N. Dharmaraj, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 3376, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.001>.