

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

Luciana Batista de Paulo Sâmia

**BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE CHALCONA E DE NITROGÊNIO
MOSTARDA E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS: ATIVIDADE CITOTÓXICA EM
CÉLULAS TUMORAIS E INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS**

Belo Horizonte
2018

UFMG/ICEx/DQ. 1266^a
T. 571^a

Luciana Batista de Paulo Sâmia

**BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE CHALCONA E DE NITROGÊNIO
MOSTARDA E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS: ATIVIDADE CITOTÓXICA EM
CÉLULAS TUMORAIS E INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS**

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

Belo Horizonte
2018

S639b
2018
T

Sâmia, Luciana Batista de Paulo
Bases de Schiff derivadas de chalcona e de
nitrogênio mostarda e seus complexos metálicos
[manuscrito] : atividade citotóxica em células
tumorais e interação com biomoléculas / Luciana
Batista de Paulo Sâmia. 2018.
[xv], 105 + [42] 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. Química
bioinorgânica - Teses 3. Schiff, Bases de - Teses 4.
Complexos metálicos - Teses 5. Agentes antineoplásicos
- Teses 6. Mecanismo de ação (Bioquímica) - Teses I.
Beraldo, Heloisa de Oliveira, Orientadora II. Título.

CDU 043

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEX



"Bases de Schiff Derivadas de Chalcona e de Nitrogênio Mostarda e seus Complexos Metálicos: Atividade Citotóxica em Células Tumerais e Interação com Biomoléculas"

Luciana Batista de Paulo Sâmia

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG

Roberto de Barros Faria

Prof. Roberto de Barros Faria
UFRJ

Julio Santos Rebouças
Prof. Julio Santos Rebouças
UFPB

Cynthia Peres Demicheli
Profa. Cynthia Peres Demicheli
UFMG

Elene Cristina Pereira Maia
Profa. Elene Cristina Pereira Maia
UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2018.

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

Dedico esse trabalho aos meu pais Eliane (sempre presente) e Élio pelo apoio de toda uma vida e por todo amor. Dedico ao meu amado marido Diego, por ser o maior incentivador desse sonho, por acreditar em mim, pelo amor e atenção e por permanecer ao meu lado me apoiando e me guiando sempre com sua sabedoria. Amo vocês!

Agradecimentos

À Deus por me amparar em todos os momentos e sempre guiar meus passos.

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

Aos meus irmãos Chris, Rei e Rafa, pelo companheirismo e amor.

À Moísa e ao Salsicha, pela amizade e carinho.

À toda minha família pelo apoio sempre, principalmente Ló, Edgar, Mariana, Jack, Dudu, Ana Luiza, Lucas e Lorena por tornarem BH mais agradável.

À minha querida amiga Livi por me acolher quando cheguei.

Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo.

Aos queridos amigos de trabalho e da vida, Camila, Ana Pachelli e Lucius, pelo apoio e ensinamentos ao longo do doutorado. Obrigada pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos alunos do grupo da Prof.^a Heloisa Beraldo, Alexandre, Ana Paula, Ane Francielly, Andrea, Angel, Elisa, Isabella, Lucas, Ligiane, Lenka, Gabrielli e Rafael pelo trabalho em equipe e aprendizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao departamento de Química da UFMG 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. Nivaldo Spezziali (UFMG), Prof.^o Dr. Alessandro Desideri. (Tor Vergata-ROMA), Dr. Hélio Anderson Duarte (UFMG), Dr.^a Elaine M. S. Fagundes (UFMG) e Dr. Adilson K. Ferreira (USP) pela colaboração na realização deste trabalho.

À Ivana do laboratório de RMN pela ajuda de sempre.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Obrigada!

Resumo

Bases de Schiff derivadas de chalcona e de nitrogênio mostarda e seus complexos metálicos: atividade citotóxica em células tumorais e interação com biomoléculas

O presente trabalho consistiu na investigação de bases de Schiff contendo os grupos farmacofóricos chalcona e nitrogênio mostarda, assim como seus complexos de platina(II), paládio(II) e ouro(III) visando o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antitumorais.

Foram obtidos os complexos $[\text{Au}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{Pt}(\text{L1})\text{Cl}]0,5\text{KCl}$ (**2**), $[\text{Pd}(\text{L1})\text{Cl}]\text{KCl}$ (**3**) e $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]$ (**4**) com 3-(4-bromofenil)-1-piridina-2-ilprop-2-en-1-ona tiossemicarbazona (**HL1**). Avaliou-se a atividade citotóxica dos compostos frente a linhagens de células leucêmicas e de tumores sólidos, e frente a células não tumorais Vero. Em geral **4** foi mais ativo frente às linhagens de células tumorais testadas, com melhores resultados frente às linhagens leucêmicas JURKAT e THP-1 e frente às células de câncer de mama MCF-7, sendo de 6 a 13 vezes mais ativo que o ligante livre. No entanto, o complexo foi também o mais tóxico nas células sadias VERO. O complexo (**1**) foi mais ativo que o ligante livre frente à maioria das linhagens de células tumorais testadas. Quando comparado a **4**, **1** desperta interesse devido à sua seletividade, pois não apresentou toxicidade nas células sadias VERO. Os complexos (**2**) e (**3**) foram inativos.

O modo de ação dos complexos (**1**) e (**4**) foi investigado através de estudos da atividade inibitória *in vitro* das enzimas Tiorredoxina Redutase (TrxR) e Topoisomerase IB (Topo IB), e por meio de estudos de interação dos compostos com DNA plasmidial.

O ligante (**HL1**) e CuCl_2 não inibiram a enzima TrxR. Os valores de CI_{50} obtidos para a inibição da atividade enzimática de TrxR foram: complexo (**1**) $\text{CI}_{50} = 5,55 \mu\text{M}$; auranofina $\text{CI}_{50} = 0,30 \mu\text{M}$; HAuCl_4 $\text{CI}_{50} = 0,62 \mu\text{M}$; complexo (**4**) $\text{CI}_{50} = 9,63 \mu\text{M}$. Assim, TrxR poderia ser um alvo para a ação citotóxica dos complexos (**1**) e (**4**)

Os complexos (**1**) e (**4**) inibiram de forma dose-dependente a atividade da Topo IB. Após a pré-incubação da enzima com os compostos antes da adição do DNA, observou-se uma melhora no efeito inibitório dos compostos. A uma concentração de $1,5 \mu\text{M}$, **1** inibiu completamente a enzima. É importante observar que HAuCl_4 sozinho foi capaz de inibir a topoisomerase IB, mas nesse caso a inibição nunca é completa. Para **4** a inibição completa da atividade enzimática é verificada para a concentração de $0,75 \mu\text{M}$. Nenhum efeito inibitório foi observado após a incubação da enzima com a tiossemicarbazona livre ou com CuCl_2 até a concentração de $50 \mu\text{M}$.

Na presença de 12 μM de **4** a etapa de clivagem foi inibida fortemente e observou-se uma inibição parcial a etapa de religação. Experimentos de docagem molecular mostraram que pela coordenação ao metal o ligante adota uma conformação adequada para a interação no sítio ativo de Topo IB. Estudos de interação dos compostos com o DNA revelaram que os complexos (**1**) e (**4**) não interagem diretamente com o DNA.

Na segunda parte do presente trabalho, obtiveram-se três hidrazonas contendo o grupo nitrogênio mostarda: 4-[*bis*(2-cloroetil)amino]benzaldeído] fenilhidrazona (**HL2**), 4-[*bis*(2-cloroetil)amino]benzaldeído]-*para*-clorofenil-hidrazona (**HL3**) e 4-[*bis*(2-cloroetil)amino]benzaldeído]-metil-hidrazona (**HL4**). Em razão da baixa afinidade de ouro(III) por ligantes contendo oxigênio como átomos doadores, não foi possível obter complexos de ouro das hidrazonas aqui estudadas. Foram obtidas também três tiossemicarbazonas: 4-[*bis*(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-feniltiossemicarbazona (**HL5**), 4-[*bis*(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-*para*-clorofenil-tiossemicarbazona (**HL6**), 4-[*bis*(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-metil-tiossemicarbazona (**HL7**) e os complexos [Au(L5)Cl₂]2HCl (**5**), [Au(L6)Cl₂]2HCl.2H₂O (**6**) e [Au(L7)Cl₂]2HCl.H₂O (**7**).

Avaliou-se a atividade citotóxica dos compostos frente a linhagens de células de melanoma, câncer de pulmão, câncer de mama e frente a células saudáveis. De uma forma geral, os compostos não foram ativos frente às linhagens testadas. No entanto, **HL5** apresentou uma atividade seletiva e específica contra as células de melanoma B16F10. Devido à especificidade de **HL5**, ampliaram-se os estudos desse composto para diferentes linhagens celulares de melanoma. Nessa etapa, testou-se também o análogo estrutural **HL2** o qual revelou-se inativo. Os complexos de ouro mostram-se também pouco ativos como agentes citotóxicos.

Um estudo de mecanismo de ação de **HL5** mostrou que seus efeitos antimelanoma ocorrem através da indução da morte celular por necrose em células B16F10. **HL5** provavelmente aumenta a sensibilidade das células aos agentes quimioterápicos e poderia ser usado em associação com medicamentos antimelanoma.

Para tentar explicar a razão pela qual apenas **HL5** foi capaz de induzir efeitos citotóxicos, estudos teóricos foram realizados, os quais indicaram que todos os ligantes e complexos de ouro teriam a mesma capacidade de atuar como agentes alquilantes do DNA, sugerindo que ou o processo de alquilação não ocorre ou, se ocorrer, não seria um processo determinante para o mecanismo de ação de **HL5**. Como os ligantes **HL2**, **HL5**-**HL7** mostram valores muito distintos de logP, a hipótese de que apenas **HL5** tivesse as características adequadas de lipofilia para interagir com o alvo biológico não pode ser descartada.

Estudos de interação dos compostos com o DNA revelaram que o efeito antiproliferativo de **HL5** e **5** observado nas células tumorais não ocorre por meio da interação direta desse composto com o DNA.

Palavras-chave: bases de Schiff, chalconas, N-mostarda, complexos metálicos, atividade citotóxica, mecanismo de ação.

Abstract

Schiff bases derived from chalcone and mustard nitrogen and their metal complexes: cytotoxic activity in tumor cells and interaction with biomolecules

The present study consisted of the investigation of Schiff bases containing chalcone and mustard nitrogen pharmacophoric groups, as well as their platinum (II), palladium (II) and gold (III) complexes for the development of new antitumor drug candidates.

The complexes [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0.5KCl (**2**), [Pd(L1)Cl]KCl (**3**) and [Cu(L1)Cl] (**4**) with 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-onethiosemicarbazone (**HL1**) were obtained. The cytotoxic activity of the compounds against leukemic and solid tumor cell lines and against non-tumor cells Vero was evaluated. In general, **4** was more active against the tumor cell lines tested, with better results against the JURKAT and THP-1 leukemic lines and MCF-7 breast cancer cells, being 6 to 13 times more active than the free ligand. However, the complex was also the most toxic in VERO healthy cells. Complex (**1**) was more active than the free ligand against most of the tumor cell lines tested. When compared to **4**, **1** arouses interest due to its selectivity, since it did not present toxicity in the VERO healthy cells. Complexes (**2**) and (**3**) were inactive.

The mode of action of complexes (**1**) and (**4**) was investigated by studies *in vitro* of the inhibitory activity of the enzymes Thioredoxin Redutase (TrxR) and Topoisomerase IB (Topo IB) and by interaction studies of the compounds with plasmid DNA.

The ligand (**HL1**) and CuCl₂ did not inhibit the enzyme TrxR. The IC₅₀ values obtained for the inhibition of TrxR enzyme activity were: complex (**1**) IC₅₀ = 5.55 μM; auranofin IC₅₀ = 0.30 μM; HAuCl₄ IC₅₀ = 0.62 μM; complex (**4**) IC₅₀ = 9.63 μM. Thus, TrxR could be a target for the cytotoxic action of complexes (**1**) and (**4**).

Complexes (**1**) and (**4**) dose-dependently inhibited Topo IB activity. After pre-incubation of the enzyme with the compounds prior to DNA addition, an improvement in the inhibitory effect of the compounds was observed. At a concentration of 1.5 μM, **1** completely inhibited the enzyme. It is important to note that HAuCl₄ alone was able to inhibit the Topo IB, but in this case, the inhibition is never complete. For **4** the complete inhibition of the enzymatic activity is verified for the concentration of 0.75 μM. No inhibitory effect was observed after incubation of the enzyme with the free thiosemicarbazone or with CuCl₂ up to the concentration of 50 μM.

In the presence of 12 μM of **4** the cleavage step was strongly inhibited and partial inhibition was observed at the religation step. Experiments of molecular docking showed that the coordination to the metal ligand adopts a proper conformation for interaction in the active site of Topo IB. Studies of the interaction of the compounds with the DNA revealed that the complexes (**1**) and (**4**) do not interact directly with the DNA.

In the second part of the present work, three hydrazones containing the mustard nitrogen group were obtained: 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde]phenylhydrazone (**HL2**), 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde]-*para*-chlorophenylhydrazone (**HL3**) and 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde]-methylhydrazone (**HL4**). Due to the low affinity of gold (III) for ligands containing oxygen as donor atoms, it was not possible to obtain gold complexes of the hydrazones studied here. Three thiosemicarbazones were also obtained: 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-N(4)-phenylthiosemicarbazone (**HL5**), 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-N(4)-*para*-chlorophenylthiosemicarbazone (**HL6**) and 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-N(4)-methylthiosemicarbazone (**HL7**) and the complexes $[\text{Au}(\text{L5})\text{Cl}_2]2\text{HCl}$ (**5**), $[\text{Au}(\text{L6})\text{Cl}_2]2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) and $[\text{Au}(\text{L7})\text{Cl}_2]2\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**7**).

The cytotoxic activity of the compounds was evaluated against melanoma cell lines, lung cancer, breast cancer and healthy cells. In general, the compounds were not active against the tested cell lines. However, **HL5** showed selective and specific activity against B16F10 melanoma cells. Due to the specificity of **HL5**, studies of this compound were amplified for different melanoma cell lines. In this step, the structural analogue **HL2** was also tested and found to be inactive. Gold complexes also appear to be poorly active as cytotoxic agents.

A study of the mechanism of action of **HL5** has shown that its antimelanoma effects occur through the induction of cell death by necrosis in B16F10 cells. **HL5** probably increases the sensitivity of cells to chemotherapeutic agents and could be used in combination with antimelanoma drugs.

To attempt to explain why only **HL5** was able to induce cytotoxic effects, theoretical studies were conducted, which indicated that all binders and gold complexes would have the same ability to act as DNA alkylating agents, suggesting that either the alkylation does not occur or, if it occurs, would not be a determining process for the mechanism of action of **HL5**.

As the **HL2**, **HL5-HL7** ligands show very distinct values of logP, the hypothesis that only **HL5** has the proper characteristics of lipophilicity to interact with the biological target can not be ruled out.

Studies of interaction of the compounds with DNA revealed that the antiproliferative effect of **HL5** and **5** observed in tumor cells does not occur through the direct interaction of this compound with DNA.

Keywords: Schiff bases, chalconas, N-mustard, metallic complexes, cytotoxic activity, mechanism of action.

Sumário

Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Química Inorgânica Medicinal	1
1.2. Câncer	3
1.3. Agentes Alquilantes	5
1.4. Tiossemicarbazonas e a química medicinal	9
1.5. Hidrazonas e a química medicinal	13
1.6. Chalconas	15
1.7. Platina: atividade farmacológica e uso na medicina	19
1.8. Paládio: atividade farmacológica e uso na medicina	22
1.9. Ouro: atividade farmacológica e uso na medicina	24
1.10. O presente trabalho: Objetivos	31
Capítulo 2. Parte experimental	32
2.1. Materiais, equipamentos e procedimentos	32
2.1.1 Reagentes e solventes.....	32
2.1.2. Determinação de temperaturas de fusão.....	32
2.1.3 Pesagens.....	32
2.1.4 Análise elementar.....	32
2.1.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	32
2.1.6 Análises condutimétricas.....	32
2.1.7 Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).....	33
2.1.8 Análises térmicas.....	33
2.1.9 Cristalografia por difração de raio-X.....	33
2.2 Síntese dos ligantes e complexos	33
2.2.1 Síntese da tiossemicarbazona derivada de chalcona e seus complexos de ouro(III), platina(II) e paládio(II)	34
2.2.1.1 Preparação da chalcona: 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4BrPh).....	34
2.2.1.2 Síntese de 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-onatiossemicarbazona [HPyCT4BrPh] (HL1).....	34
2.2.1.3 Síntese do complexo cloreto de [cloro(3-(4-bromo-fenil)-1-piridin-2-ilprop-2-en-1-en-thiossemicarbazonato)ouro(III)], [Au(L1)Cl]Cl (I).....	35

2.2.1.4 Síntese do complexo [cloro(3-(4-bromo-fenil)-1-piridin-2-ilprop-2-en-1-en-thiossemicarbazonato)platina(II)]hemi cloreto de potássio, [Pt(L1)Cl]0,5KCl (2).....	35
2.2.1.5 Síntese do complexo [cloro(3-(4-bromo-fenil)-1-piridin-2-ilprop-2-en-1-en-thiossemicarbazonato)paládio(II)]cloreto de potássio, [Pd(L1)Cl]KCl (3).....	35
2.2.2 Síntese das hidrazonas contendo o grupo farmacofórico N-mostarda.....	37
2.2.2.1 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído fenilhidrazona,(HL2); 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-p-cloro-fenilhidrazona,(HL3); 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-metil-hidrazona, (HL4).....	37
2.2.3 Síntese das tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico N-mostarda e seus complexos de ouro(III).....	38
2.2.3.1 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-feniltiossemicarbazona, (HL5).....	38
2.2.3.2 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-p-cloro-feniltiossemicarbazona, (HL6).....	38
2.2.3.3 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N-metiltiossemicarbazona,(HL7).....	39
2.2.3.4 Síntese dos complexos de ouro(III) de bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído N(4)-feniltiossemicarbazona [Au(L5)Cl ₂] (5), N(4)-p-cloro-feniltiossemicarbazona [Au(L6)Cl ₂] (6), e N-metiltiossemicarbazona [Au(L7)Cl ₂] (7).....	39
2.3. Ensaios biológicos.....	40
2.3.1 Avaliação da atividade citotóxica de 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-onatiossemicarbazona, (HL1) e seus complexos metálicos.....	40
2.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos da série tiossemicarbazona/hidrazona contendo o grupo farmacofórico N-mostarda.....	41
2.3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura.....	42
2.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade.....	42
2.3.2.3 Avaliação de morte celular por Anexina V-FITC / Iodeto de Propídeo.....	42
2.3.2.4 Análises Western blot.....	43
2.3.3 Estudos de inibição da enzima Tiorredoxina Redutase (TrxR).....	43
2.3.4 Estudos de interação com DNA plasmidial.....	44
2.3.5 Estudos de inibição da enzima Topoisomerase IB.....	44
2.3.5.1 Ensaio de relaxação do DNA.....	44
2.3.5.2 Cinética de clivagem.....	45

2.3.5.3 Cinética de religação.....	45
2.3.5.4 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética.....	45
2.3.5.5 Docagem molecular.....	46
2.3.6 Estudos teóricos.....	47
Capítulo 3: Complexos de ouro(III), paládio(II) e platina(II) de 3-(4-bromofenil)-1-piridina-2-ilprop-2-en-1-ona tiossemicarbazona, HPyCT4BrPh, (HL1).....	48
3.1. Caracterização dos compostos.....	48
3.1.1. Análises.....	48
3.1.2. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear.....	50
3.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	55
3.2 Avaliação da atividade biológica da tiossemicarbazona e seus complexos.....	56
3.2.1 Atividade citotóxica.....	56
3.2.2 Inibição da atividade enzimática da Tiorredoxina Redutase (TrxR).....	59
3.2.3 Estudos de interação com DNA plasmidial.....	61
3.2.4 Inibição da atividade enzimática da Topoisomerase IB.....	62
Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda. Complexos de ouro(III) das tiossemicarbazonas.....	69
4.1 Hidrazonas derivadas de bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído.....	69
4.1.1. Análises.....	69
4.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear.....	70
4.1.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	74
4.1.1.4. Cristalografia de Raios X.....	75
4.2 Tiossemicarbazonas derivadas de bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído e seus complexos de ouro(III).....	78
4.2.1 Análises.....	78
4.2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear.....	80
4.2.1.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	85
4.2.1.3. Cristalografia de Raios X.....	86
4.3 Avaliação da atividade biológica da hidrazona, das tiossemicarbazonas e seus complexos.....	89

<i>4.3.1 Atividade citotóxica.....</i>	89
<i>4.3.2 Avaliação de morte celular</i>	91
<i>4.3.3 Investigação dos níveis de expressão das proteínas das vias de sinalização apoptóticas.....</i>	93
<i>4.3.4 Estudos de interação com DNA plasmidial.....</i>	96
<i>4.3.5 Investigações teóricas sobre a capacidade de alquilação dos compostos base de Schiff contendo o substituinte nitrogênio mostarda.....</i>	97
Capítulo 5: Conclusões	102

Anexos

Lista de abreviaturas

↑	Convenção no DEPT135 para CH e CH ₃
↓	Convenção no DEPT135 para CH ₂
δ	Deslocamento químico em ppm
B16F10	Linhagem de melanoma murino
BSA	Albumina Sérica Bovina
¹³ C	Isótopo do carbono com 13 unidades de massa atômica
CI ₅₀	Concentração capaz de inibir o desenvolvimento de 50% dos indivíduos testados
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Diagrama ORTEP	Tipo de representação gráfica usada em cristalografia para representar os átomos por meio de seus elipsoides térmicos
DMF	4, 4-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Dodecil Sulfato de Sódio
DTNB	5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
¹ H	Isótopo do hidrogênio com 1 unidade de massa atômica
HCT-116	Linhagem de células de carcinoma colorretal humano
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica aguda
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HUVEC	Linhagem de células endoteliais da veia umbilical humana
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Jurkat	Linhagem de células de leucemia de linfócitos T
KBr	Brometo de potássio

LabCri	Laboratório de Cristalografia da UFMG
m	Multiplete
M.M	Massa Molar
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma de mama
MDA-MB 231	Linhagem de células de carcinoma de mama
MeOH	Metanol
MeOD- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
MHz	Megahertz
MTT	3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2il)-2,5-difenil-2H-3-tetrazólio
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCI-H460	Linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
P.A	Solvente puro para análise
ppm	Partes por milhão
RDR	Ribonucleosídeo Difosfato Redutase
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Simpleto
t	Triplete
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
TG	Análise termogravimétrica
THP-1	Linhagem de células de leucemia monocíticas
TMS	Tetrametilsilano
TNB	5-tio-2-nitrobenzóico
TrxR	Tiorredoxina Redutase
Vero	Linhagens de células sadias do rim de macaco verde

Lista de Figuras

Figura 1.1: Estrutura da cisplatina.....	1
Figura 1.2: Representação estrutural dos complexos metálicos utilizados clinicamente: auranofina (A); carbonato de lítio (B); nitroprussiato de sódio (C); cardiolite (D).....	2
Figura 1.3: Estimativa da incidência de câncer por sexo para 2016.....	4
Figura 1.4: Planejamento terapêutico para o tratamento do câncer.....	5
Figura 1.5: Estruturas das classes de agentes alquilantes.....	6
Figura 1.6: Estruturas das mostardas nitrogenadas aprovadas para uso clínico Clorometina e Clorambucil.....	8
Figura 1.7: Mecanismo de ação da mostarda nitrogenada (Clorometina) com o DNA.	9
Figura 1.8: Representação estrutural genérica para tiossemicarbazonas.....	10
Figura 1.9: Representação das estruturas de: (A) 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (“Tioacetazona”); (B) 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (Triapina).....	11
Figura 1.10: Estruturas dos complexos com tiossemicarbazonas com atividade antitumoral.....	13
Figura 1.11: Estrutura geral das hidrazonas (A); de acil hidrazonas (B); do derivado 2- acetilpiridinahidrazona (C).....	14
Figura 1.12: Estruturas dos complexos com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2- benzoilpiridina.....	15
Figura 1.13: Estrutura genérica das chalconas.....	16
Figura 1.14: Estruturas das chalconas utilizadas clinicamente: (A) Metochalcona e (B) Sofalcona.....	16
Figura 1.15: Estruturas de: (A) análogo de Xanthohumol; (B) compostos sintetizados por Gan e colaboradores.....	18
Figura 1.16: Estruturas das chalconas (A) WO2013054998 A1; (B) WO2012017454 A1; (C) EP 2601943 A1.....	18
Figura 1.17: Modo de coordenação da cisplatina ao DNA.....	19
Figura 1.18: Representação estrutural dos compostos de platina(II) utilizados no tratamento do câncer: (A) cisplatina; (B) carboplatina; (C) oxalapatina; (D) nedaplatina; (E) loblaplatina.; (F) heptaplatina.....	20
Figura 1.19: Compostos de platina(II) com ligantes variados.....	21

Figura 1.20: Complexos de paládio(II) como agentes antitumorais: (A) cispaládio; (B) complexo de paládio(II) com ligantes derivados de quinolina; (C) complexo de paládio(II) com ligantes glicoconjugados; (D) complexo de paládio(II) com ligante derivado de terpiridina.....	23
Figura 1.21: Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da artrite reumatóide.....	24
Figura 1.22: Estruturas dos complexos de ouro(I) com atividade antitumoral.....	26
Figura 1.23: Estrutura do complexo de ouro contendo o ligante 2-dimetilamino-metil-fenil (damp).....	27
Figura 1.24: Estrutura PDB 3QFB da TrxR.....	28
Figura 1.25: Ciclo de reações redox da TrxR.....	29
Figura 1.26: Estrutura PDB 1A36 do complexo DNA-Topoisomerase IB.....	30
Figura 2.1: Esquema de reação para obtenção da chalcona e da tiossemicarbazona (HL1).....	34
Figura 2.2: Esquema das rotas sintéticas para obtenção dos complexos (1), (2) e (3).....	36
Figura 2.3: Estrutura do complexo (4).....	36
Figura 2.4: Esquema de reação para obtenção das hidrazonas HL2-HL4.....	37
Figura 2.5: Esquema de reação para obtenção das tiossemicarbazonas HL5-HL7.....	39
Figura 2.6: Esquema da rota sintética para obtenção dos complexos (5), (6) e (7).....	40
Figura 3.1: Estruturas propostas para o ligante HPyCT4BrPh (HL1) e os complexos [Au(L1)Cl]Cl (1), e [Pt(L1)Cl]0,5KCl (2) [Pd(L1)Cl]KCl (3).....	49
Figura 3.2: Representação dos isômeros configuracionais E e Z de HPyCT4BrPh (HL1).....	50
Figura 3.3: Representação estrutural de HPyCT4BrPh (HL1) e numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes.....	50
Figura 3.4: Espectros de RMN de ¹ H (400MHz) de: (A) HPyCT4BrPh (HL1) e (B) [Pd(L1)Cl]KCl (3) obtidos em DMSO-d ₆	53
Figura 3.5: Espectros de RMN de ¹³ C (a 100 MHz) de: (A) HPyCT4BrPh (HL1) e (B) [Pd(L1)Cl]KCl (3) obtidos em DMSO-d ₆	54
Figura 3.6: Espectros de absorção na região do infravermelho: (A) HPyCT4BrPh (HL1) e (B) [Pt(L1)Cl]0,5KCl (2) obtidos em pastilha de KBr.....	56

Figura 3.7: Efeito inibitório de HAuCl_4 , auranofina, $[\text{Au}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) e $\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}$ (**4**), sobre a atividade da TrxR. A enzima foi incubada com DMF 2,5% (controle) e com os compostos na concentração de $10\mu\text{M}$ por 1h a 37°C . A atividade da TrxR foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da atividade da TrxR..... 60

Figura 3.8: Estudo de eletroforese em gel de agarose com o DNA plasmidial pUC19, tratado com cisplatina, HPyCT4BrPh (**HL1**), $[\text{Au}(\text{L}1)\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) e $[\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}]$ (**4**), HAuCl_4 , CuCl_2 , a $100\mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Período de incubação 24h a 37°C 61

Figura 3.9: Relaxação do DNA super-enovelado pela topoisomerase IB na presença de concentrações crescentes (colunas 4-13) de complexo (**1**) (**A**) e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**B**). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de $400\mu\text{M}$ do complexo (**1**) ou $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Coluna 3: DNA plasmidial na presença da enzima. (**C**) Atividade da relaxação da Topo IB na presença de: E-DNA (colunas 3-6); $1,5\mu\text{M}$ complexo (**1**) (colunas 7-10); depois de 5 minutos de pré-incubação da enzima-complexo (**1**), antes da adição do substrato (colunas 11-14); depois de 5 minutos de pré-incubação DNA-complexo (**1**), antes da adição da enzima (colunas 15-18). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de $1,5\mu\text{M}$ complexo (**1**). (**D**) Atividade da relaxação da Topo IB na presença de: E-DNA (colunas 3-6); $1,5\mu\text{M}$ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (colunas 7-10); depois de 5 minutos de pré-incubação da enzima- $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, antes da adição do substrato (colunas 11-14); depois de 5 minutos de pré-incubação DNA- $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, antes da adição da enzima (colunas 15-18). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de $1,5\mu\text{M}$ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 63

Figura 3.10: Relaxação do DNA plasmidial super-enovelado em concentrações crescentes de: (A) tiossemicarbazona livre. Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 50 μM de HL1 ; (B) complexo (4); (C) CuCl_2 . Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 50 μM do complexo (4) ou CuCl_2 ; Coluna 3: DNA plasmidial na presença da enzima; Coluna 4-10: E-DNA na presença de concentrações crescentes dos compostos. (D) Relaxação do DNA plasmidial super-enovelado em função do tempo na presença de: E-DNA (colunas 2-5); 0,75 μM do complexo (4) (colunas 6-9); 5 minutos da enzima-complexo pré-incubados antes da adição do DNA (colunas 10-13); 5 minutos do DNA-complexo pré-incubados antes da adição da enzima (colunas 14-17). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 0,75 μM complexo (4).....	64
Figura 3.11: (A) Estudo de eletroforese em gel de ureia/poliacrilamida dos produtos de clivagem obtidos na ausência (colunas 2-9) e na presença de 12 μM do complexo (4) (colunas 10-17); coluna 1: substrato; (B) Porcentagem de clivagem em função do tempo na ausência (linha contínua) e na presença de 12 μM do complexo (4) (linha tracejada).....	65
Figura 3.12: (A) Estudo de eletroforese em gel de ureia/poliacrilamida dos produtos da reação de religação realizado pela enzima topo IB na ausência (colunas 2-8) e na presença de 12 μM do complexo (4) (colunas 9-15); coluna 1: substrato; (B) Porcentagem remanescente do complexo de clivagem em função do tempo na ausência (linha contínua) e na presença de 12 μM do complexo (4) (linha tracejada).....	66
Figura 3.13: Estudo de eletroforese em gel de poliacrilamida de: Coluna 1: DNA; coluna 2: DNA na presença de 12 μM do complexo (4); coluna 3: DNA + enzima + DMSO; coluna 4: DNA + enzima + 12 μM do complexo (4); coluna 5: DNA + enzima + 50 μM camptotecina.....	67
Figura 3.14: Previsões de acoplamento do modo de ligação do complexo (4) e a proteína sozinha.....	67
Figura 3.15: Previsões de acoplamento do modo de ligação do complexo (4) com: (A) complexo covalente; (B) complexo suicida.....	68
Figura 4.1: Estruturas propostas para as hidrazonas HL2 , HL3 e HL4	69
Figura 4.2: Isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> de HL4	70
Figura 4.3: Estruturas das hidrazonas e numeração adotada para as atribuições dos átomos constituintes.....	71

Figura 4.4: Espectro de RMN de ^1H (a 400MHz) da hidrazona HL2 obtido em DMSO- d_6	72
Figura 4.5: Espectros de RMN de ^{13}C (a 100 MHz) da hidrazona HL2 obtido em DMSO- d_6	73
Figura 4.6: Espectro de RMN NOESY da hidrazona HL2 obtido em DMSO- d_6	73
Figura 4.7: Espectros de absorção na região do infravermelho das hidrazonas HL2 , HL3 e HL4 obtidos em pastilhas de KBr.....	75
Figura 4.8: Diagrama ORTEP para a hidrazona (HL2).....	76
Figura 4.9: Estruturas propostas para os ligantes HL5 , HL6 e HL7 e para os complexos de ouro(III) (5), (6) e (7).....	79
Figura 4.10: Estruturas das tiossemicarbazonas e numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes.....	80
Figura 4.11: Espectros de RMN de ^1H (a 400MHz): (A) ligante HL5 e (B) complexo (5), obtidos em DMF- d_7	83
Figura 4.12: Espectros de RMN de ^{13}C (a 100MHz): (A) ligante HL5 e (B) complexo (5), obtidos em DMF- d_7	84
Figura 4.13: Espectros de absorção na região do infravermelho: (A) do ligante HL5 e (B) do complexo (5), obtidos em pastilhas de KBr.....	86
Figura 4.14: Diagrama ORTEP para a tiossemicarbazona HL6	87
Figura 4.15: Necrose em células de melanoma B16F10 por HL5 . As células foram tratadas por 12 h com HL5 (10 e 20 μM) ou cisplatina 50 μM (controle positivo para apoptose), coradas duas vezes com anexina V/PI e analisadas por citometria de fluxo (potenciômetros de pontos em (A)). A % de células necróticas (anexinV-/PI+) e apoptóticas (anexinV+/PI+ e anexinV+/PI-) foram consideradas separadamente. HL5 aumentou a população celular necrótica e apoptótica (***) $p < 0,001$ versus controle), embora a via principal da morte celular fosse necrose. Todos esses dados são significativos da porcentagem de células positivas \pm DP (n = 3).....	93

Figura 4.16: Redução da expressão de Bcl-2 em células B16F10 por HL5 . A expressão das proteínas da morte celular foi avaliada após o tratamento das células B16F10 durante 24h com HL5 (10 e 20µM) ou 50µM de cisplatina (controle positivo para a apoptose), lise celular e análise Western Blot. HL5 não apresentou característica apoptótica, mas afetou as proteínas mitocondriais: redução de Bcl-2 associada ao aumento da expressão de BAD. As imagens da membrana Western blot são representativas de três experimentos independentes.....	95
Figura 4.17: Estudo de eletroforese em gel de agarose com o DNA plasmidial pUC19, tratado com cisplatina, HL5 , HL6 , HL7 , (5), (6), (7) e H _{Au} Cl ₄ , a 100 µM em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Período de incubação 24h a 37 °C.....	97
Figura 4.18: Mecanismo de alquilação do DNA pelo agente alquilante nitrogênio mostarda.....	97
Figura 4.19: Etapa de reação de ciclização da mostarda nitrogenada.....	98
Figura 4.20: Reação do grupo nitrogênio da mostarda com a espécie nucleofílica BF ₃ ...	100

Lista de Tabelas

Tabela 1: Agentes alquilantes utilizados na clínica e suas aplicações.....	7
Tabela 2.1: Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ (DMF).....	33
Tabela 3.1: Dados de caracterização da tiossemicarbazona HPyCT4BrPh (HL1) e seus complexos [Au(L1)Cl]Cl (1), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (2) e [Pd(L1)Cl]KCl (3).....	49
Tabela 3.2: Atribuições, deslocamentos químicos (ppm) e multiplicidade a dos principais sinais de RMN de ¹ H (a 400 MHz) de HPyCT4BrPh (HL1) e dos complexos de [Au(L1)Cl]Cl (1), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (2) e [Pd(L1)Cl]KCl (3).....	51
Tabela 3.3: Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ¹³ C e subspectros DEPT135 de HPyCT4BrPh (HL1) e os complexos (2) e (3)(DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).....	52
Tabela 3.4: Atribuições das principais bandas (v/cm ⁻¹) de absorção na região do infravermelho de HL1 e seus complexos (1), (2) e (3).....	55
Tabela 3.5: Efeito citotóxico (CI ₅₀) da tiossemicarbazona HPyCT4BrPh (HL1) e dos complexos [Au(L1)Cl]Cl (1), [Pd(L1)Cl]KCl (3) e [Cu(L1)Cl] (4) e fármacos antitumorais (etoposídeo e cisplatina) nas linhagens celulares HL60, Jurkat, THP-1, MDA-MB 231, MCF-7, HCT-116 e Vero. Os dados são expressos como média ± erro padrão.....	58
Tabela 4.1: Dados de caracterização das hidrazonas HL2 , HL3 e HL4	69
Tabela 4.2: Atribuições (A), número de hidrogênio (N ^o), multiplicidade, deslocamentos químicos (ppm) e constante de acoplamentos (J/Hz) dos principais sinais de RMN de ¹ H (à 400MHz) dos ligantes HL2 , HL3 e HL4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	71
Tabela 4.3: Atribuição e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT-135 dos ligantes HL2 , HL3 e HL4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).....	72
Tabela 4.4: Atribuições das principais bandas (v/cm ⁻¹) de absorção na região do infravermelho das hidrazonas HL2 , HL3 e HL4	74
Tabela 4.5: Resumo da coleção de dados cristalográficos e os resultados dos refinamentos da estrutura cristalográfica do ligante (HL2).....	77

Tabela 4.6: Principais comprimentos (Å) de ligação da hidrazona (HL2). Desvio padrão entre parênteses.....	77
Tabela 4.7: Principais ângulos (°) de ligação da hidrazona (HL2). Desvio padrão entre parênteses.....	77
Tabela 4.8: Dados de caracterização das tiossemicarbazonas (HL5), (HL6) e (HL7) e seus complexos de ouro(III) (5), (6) e (7).....	79
Tabela 4.9: Atribuições (A), número de hidrogênio (N°), multiplicidade, deslocamentos químicos (ppm) e constante de acoplamentos (J/Hz) dos principais sinais de RMN de ¹ H dos ligantes (HL5), (HL6) e (HL7) e seus respectivos complexos (5), (6) e (7). (DMF- <i>d</i> ₇ , 400 MHz).....	81
Tabela 4.10: Atribuição e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ¹³ C e DEPT-135 dos ligantes (HL5), (HL6) e (HL7) e seus respectivos complexos (5), (6) e (7). (DMF- <i>d</i> ₇ , 100 MHz).....	82
Tabela 4.11: Atribuições das principais bandas (v/cm ⁻¹) de absorção na região do infravermelho dos ligantes (HL5), (HL6) e (HL7) e dos complexos (5), (6) e (7).....	85
Tabela 4.12: Resumo da coleção de dados cristalográficos e os resultados do refinamento da estrutura cristalográfica dos ligantes (HL6).....	88
Tabela 4.13: Principais comprimentos (Å) de ligação do ligante (HL6). Desvio padrão entre parênteses.....	88
Tabela 4.14: Principais ângulos (°) de ligação do ligante (HL6). Desvio padrão entre parênteses.....	88
Tabela 4.15: Efeito citotóxico (CI ₅₀) das tiossemicarbazonas (HL5), (HL6) e (HL7), dos complexos (5), (6) e (7) e do sal H ₂ AuCl ₄ .3H ₂ O, frente as linhagens celulares B16F10, NCI-H460, MCF-7 e HUVEC. Os dados são expressos como média ± erro padrão.....	90
Tabela 4.16: Efeito citotóxico (CI ₅₀) de HL5 e HL2 , frente as linhagens celulares de melanomas B16F10, A2058, A375 e frente a linhagem celular sadia HUVEC. Os dados são expressos como média ± erro padrão.....	91
Tabela 4.17: Energias de reação (kcal mol ⁻¹) estimadas utilizando diferentes funcionais de troca/correlação e conjuntos base, para a etapa de reação de ciclização da mostarda.....	98

Tabela 4.18: Densidade eletrônica dos orbitais de fronteira calculadas no nível de teoria B3LYP/D95 para os ligantes HL2 , HL5- HL7	99
Tabela 4.19: Densidade eletrônica dos orbitais de fronteira calculadas no nível de teoria B3LYP/D95 para os complexos 5 , 6 e 7	100
Tabela 4.20: Energias de reação (kcal mol ⁻¹) estimadas utilizando diferentes funcionais de troca/correlação e conjuntos base, para a reação do nitrogênio com BF ₃	101

Capítulo 1. Introdução

1.1 Química Inorgânica Medicinal

A química inorgânica medicinal tem como objetivo principal o desenvolvimento de compostos inorgânicos ou de ligantes para a utilização na medicina terapêutica e de diagnóstico. Compostos inorgânicos vêm sendo utilizados na medicina há muitos séculos, mas muitas vezes, de forma empírica com pouco ou nenhum entendimento da base molecular e de seu mecanismo de ação.¹

Os metais são utilizados na medicina há 5000 anos.² Os egípcios usavam cobre para esterilizar a água (3000 a.C); o ouro era empregado na fabricação de medicamentos na Arábia e na China (3500 a.C), mais em razão da natureza preciosa do metal do que de suas propriedades medicinais. Medicamentos contendo ferro eram usados no Egito (1500 a.C) na mesma época em que o zinco foi descoberto para cicatrização. Na era Renascentista da Europa (entre os séculos XIV e XVI), o cloreto de mercúrio foi utilizado como diurético e a essencialidade nutricional do ferro foi descoberta.³

No entanto, somente no início do século XX a atividade medicinal dos compostos inorgânicos começou a ser investigada por meio de métodos experimentais e teóricos modernos. Inicialmente, a partir dos estudos de Paul Ehrlich com complexos de arsênio ativos contra sífilis⁴ e principalmente após a descoberta das propriedades antitumorais do *cis*[diaminodichloroplatina(II)] (“cisplatina”, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), por Barnett Rosenberg em 1965. A cisplatina (Figura 1.1) é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de diversos tipos de câncer. No entanto, sua eficiência é aumentada para câncer nos testículos, ovário e bexiga, alcançando 90% de cura.²

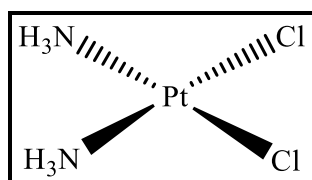


Figura 1.1: Estrutura da cisplatina.¹

A descoberta da atividade antineoplásica da cisplatina desempenhou um papel importante no estabelecimento da química inorgânica medicinal¹, porque a partir dessa descoberta, verificou-se um grande interesse pelo design racional de complexos metálicos.^{5,6,7}

¹ B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* 182 (1999) 263–295.

² C. X. Zhang, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481–489.

³ C. Orvig, M. J. Abram, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2201–2203.

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

⁵ N.P.E. Barry, P.J. Sadler, *Pure Appl. Chem.* 86 (2014) 1897–1910.

⁶ C.-H. Leung, S. Lin, H.-J. Zhong, D.-L. Ma, *Chem. Sci.* 6 (2015) 871–884.

⁷ M. Ashfaq, T. Najam, S.S.A. Shah, M.M. Ahmad, S. Shaheen, R. Tabassum, G.Rivera, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 3081–3094.

Atualmente a indústria farmacêutica investe mais de 1 bilhão de dólares por ano para o desenvolvimento de novos compostos metálicos com atividade biológica procurando seletividade e eficiência terapêutica para tentar diminuir os efeitos colaterais. Dentre esses novos complexos podemos exemplificar: complexos de prata com atividade antimicrobiana, complexos de vanádio como antidiabéticos, complexos de ferro como agentes antimalárico, complexos de antimônio para o tratamento de leishmaniose e complexo de rutênio para o tratamento de câncer (NAMI-A, em fase clínica II).⁸ O interesse econômico em compostos à base de metal para uso farmacêutico também é comprovado pelo aparecimento de mais de 60 patentes no período de 2013 a 2015 no que se refere apenas a complexos de platina para tratamentos tumorais.⁹

Uma grande variedade de compostos metálicos já é utilizada clinicamente (Figura 1.2). Por exemplo, a auranofina, [(trietilfosfina-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-1-D-tiopiranosato-S)]ouro(I), fármaco à base de ouro aprovado em 1985 para o tratamento de artrite reumatóide¹⁰, compostos de lítio usados como antidepressivos¹¹, compostos de bismuto ativos contra a bactéria *Helicobacter pylori*, causadora da úlcera¹², o nitroprussiato de ferro, empregado como vasodilatador², complexo de Gadolínio como agente de contraste para ressonância magnética e radiofármacos contendo ^{99m}Tc e ¹⁸⁶Re/¹⁸⁸Re.¹³

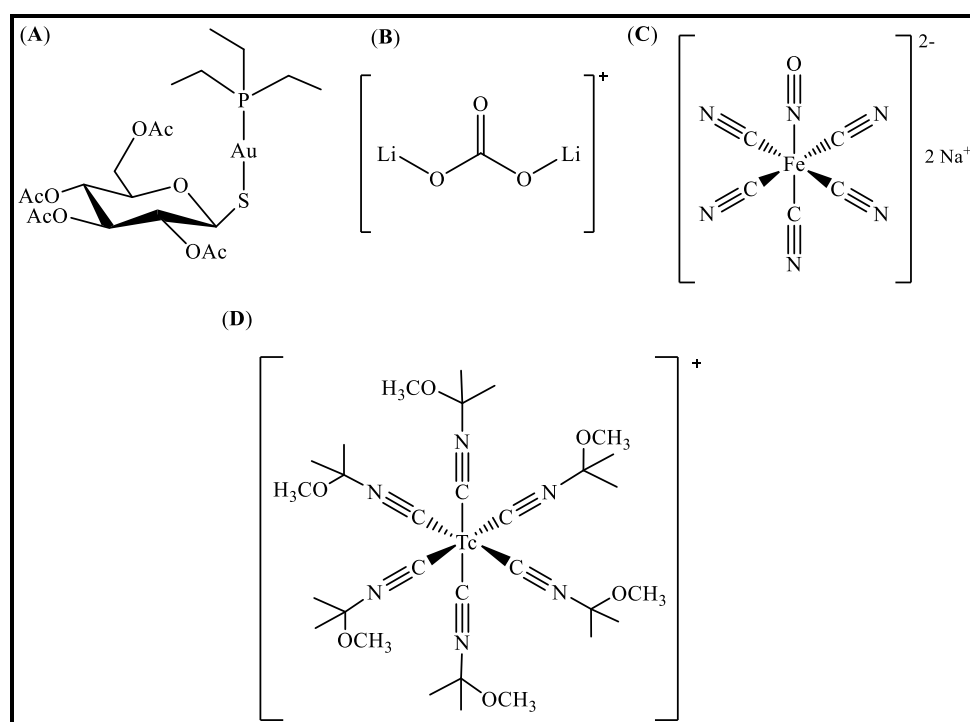


Figura 1.2: Representação estrutural dos complexos metálicos utilizados clinicamente: auranofina (A); carbonato de lítio (B); nitroprussiato de sódio (C); cardiolite (D).²

⁸ A.de Almeida, B.L. Oliveira, J.D.G. Correia, G. Soveral, A. Casini, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2689–2704.

⁹ M. Fanelli, M. Formica, V. Fusib, L. Giorgi, M. Micheloni, P. Paoli, *Coord. Chem. Rev.* 310 (2016) 41–79.

¹⁰ G. Stochel, A. Wanat, E. Kulis, Z. Stasicka, *Coord. Chem. Rev.* 171 (1998) 203–220.

¹¹ S. M. Cohen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (2007) 115–120.

¹² N. Farrell, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 1–4.

¹³ S. Ahmad, A. A. Isab, S. Ali, A. R. Al-Arfaj, *Polyhedron* 25 (2006) 1633–1645.

A atividade farmacológica desses complexos depende do íon metálico, do ligante e da estrutura dos compostos. Esses fatores são responsáveis para o alcance dos alvos adequados no organismo¹⁴.

O aumento no interesse em compostos inorgânicos quanto ao seu perfil farmacológico ocorre na esperança de se encontrar curas para diversas doenças.¹⁵ Pesquisas sobre reatividade e interação entre complexos de metais de transição e biomoléculas como DNA e proteínas, tem resultado em um avanço significativo para o entendimento de processos biológicos e a descoberta de novas drogas terapêuticas.¹⁶

1.2 Câncer

O câncer é um termo genérico utilizado para a doença que possui mais de 100 tipos.¹⁷ Todas as formas são caracterizadas por um comportamento anormal das células, como proliferação rápida e irregular, causada por uma mutação nos genes que controlam o crescimento e divisão das células.¹⁸ Essas células podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, em um processo conhecido como metástase, que é a principal causa de morte das pessoas portadoras da doença.¹⁷ As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Assim, conforme essas células vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções.¹⁹

A estimativa no Brasil é de 596 mil novos casos da doença para o biênio 2016-2017, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), sendo que, para os homens o câncer de próstata é responsável por 61% dos casos e para as mulheres o câncer de mama, o de maior incidência, é responsável por cerca de 58% dos casos. Na Figura 1.3 está representada a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo.²⁰

¹⁴ P. J. Sadler, Z. Guo, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 863–871.

¹⁵ M.Z. Hernandez, F.J. de S. Pontes, L.C.D. Coelho, D.R.M. Moreira, V.R.A. Pereira, A.C.L. Leite, *Curr. Med. Chem.* 17(2010) 3739-3750.


¹⁶T. Lazarevic, A. Rilak, Z. D. Bugarcic, *Eur. J. Med. Chem.* Article in press (2017) 1-24, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>.

¹⁷ J. P. Parker, Z. Ude, C. J. Marmion, *Metallomics*, 8 (2016) 43-60.

¹⁸ R. Bakhtiar, Ei-I. Ochiai, *General Pharm.* 32 (1999) 525–540.

¹⁹ V. L. de Almeida, A. Leitão, L. C. B. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, M. T. P. Lopes, *Quim. Nova* 28 (2005) 118-129.

²⁰INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>, acessado em 27 de fevereiro de 2018.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.3: Estimativa da incidência de câncer por sexo para 2018.²⁰

O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Por exemplo, os carcinomas (originados de células epiteliais), leucemia (originado de células da medula óssea) e tumores das células germinativas (originado de células dos testículos e/ou dos ovários).¹⁹ Existem vários tipos de tratamento (curativos) para o câncer: a quimioterapia consiste na utilização de medicamentos; a radioterapia utiliza radiações de forma localizada para tentar destruir o tumor ou impedir que eles aumentem; a imunoterapia promove a estimulação do sistema imunológico por meio do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica; a cirurgia é indicada especialmente se a doença parece estar contida em uma área localizada, e é realizada para retirar o tumor junto com qualquer tecido nas proximidades que possa conter células cancerosas.²¹

Outra forma de tratamento para o câncer inclui os chamados cuidados paliativos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), "cuidados paliativos consistem na assistência promovida por uma equipe multidisciplinar, que objetiva a melhoria da qualidade de vida do paciente e seus familiares, diante de uma doença que ameace a vida, por meio da prevenção e alívio do sofrimento, tratamento de dor e demais sintomas". Na fase inicial da doença, o tratamento geralmente é agressivo, com objetivo de cura ou remissão. Quando a doença já se apresenta em estágio avançado ou evolui para esta condição mesmo durante o tratamento com intenção curativa, a abordagem paliativa se torna a melhor estratégia para esse paciente. Na fase terminal, em que o paciente tem pouco tempo de vida, o tratamento paliativo se impõe para, através de seus procedimentos, garantir qualidade de vida.²²

Apesar dos vários tipos de tratamento, se faz necessário um planejamento terapêutico para definir qual o melhor tratamento para cada pessoa, de acordo com o tipo e o estágio da doença (Figura 1.4).

²¹ INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>, acessado em 18 de setembro de 2017.

²² INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento/cuidados_paliativos, acessado em 18 de setembro de 2017.

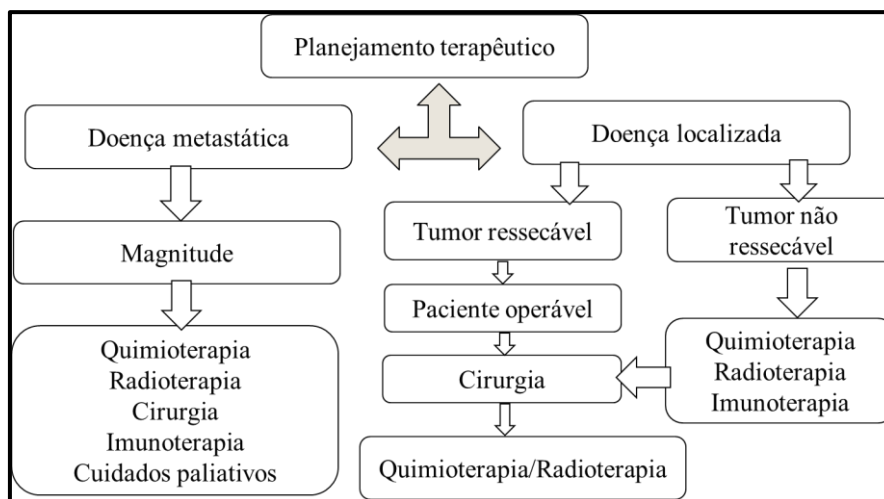


Figura 1.4: Planejamento terapêutico para o tratamento do câncer.

1.3 Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes como o gás mostarda foram utilizados pela primeira vez como armas químicas durante a primeira Guerra Mundial causando vários efeitos indesejáveis após dias de intoxicação. Esta observação dos efeitos causados pelo gás mostarda levou à primeira experimentação desse composto como agente anticancerígeno em tumores induzidos em camundongos.²³ Um incidente durante a segunda Guerra Mundial, um vazamento acidental do gás mostarda no porto italiano de Bari devido a um ataque surpresa aos navios, intoxicou vários soldados que ficaram expostos ao gás. Entre esses soldados, observou-se uma taxa significativa de hipoplasia linfóide grave e mielossupressão. Esse incidente impulsionou dois pesquisadores a estudarem uma possível atividade antitumoral dessa substância.²⁵ Em 1946, Gilman e Goodmam²⁴ sintetizaram o primeiro agente alquilante com notável atividade frente a linfomas e em 1949 a Clorometina (Figura 1.6) foi aprovada para uso clínico.

Agentes alquilantes são eletrófilos que reagem com porções nucleófilicas do DNA ou proteínas resultando na transferência covalente de um grupo alquil. O efeito citotóxico destes agentes deve-se principalmente à alquilação de bases do DNA e os sítios preferenciais de ligação desses compostos à biomolécula dependem da natureza do nucleófilo e do agente alquilante em si. Essa ligação pode prejudicar processos essenciais do DNA, tais como a replicação e/ou a transcrição.²⁵

Existem seis classes “padrões” de agentes alquilantes: (1) as mostardas nitrogenadas²⁶: foram os primeiros agentes alquilantes utilizados como quimioterápicos no tratamento de leucemias e linfomas; (2) as oxazoforinas²⁷: pró-drogas ativadas pelos citocromo no fígado e foram sintetizadas na tentativa

²³ F. E. Adair, H. J. Bagg. *Annals of Surgery* 93 (1931) 190-199.

²⁴ L. S. Goodman, M. M. Wintrobe, W. Dameshek, M. A. Gilman, *J. American Med. Assoc.* 132 (1946) 126-132.

²⁵ S. Puyo, D. Montaudon, P. Pourquier, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 89 (2014) 43–61.

²⁶ L. F. Povirk, D. E. Shuker, *Mutation Research* 318 (1994) 205-226.

²⁷ B. Giraud, G. Hebert, A. Deroussent, G. J. Veal, G. Vassal, A. Paci, *Exp. Opin. Drug Met. Toxic.* 6 (2010) 918-938.

de estabilizar e diminuir a toxicidade das mostardas nitrogenadas; (3) as etilenoiminas²⁸; são divididas em poliaziridinas e mitomicina C^{29,30}; (4) as nitrosouréias^{31,32}; (5) os alquilsulfonatos³³; (6) os triazenos³⁴ e as hidrazinas^{35,36}. As estruturas de cada classe estão representadas na Figura 1.5 e os principais fármacos bem como a utilização clínica, estão descritos na Tabela 1.

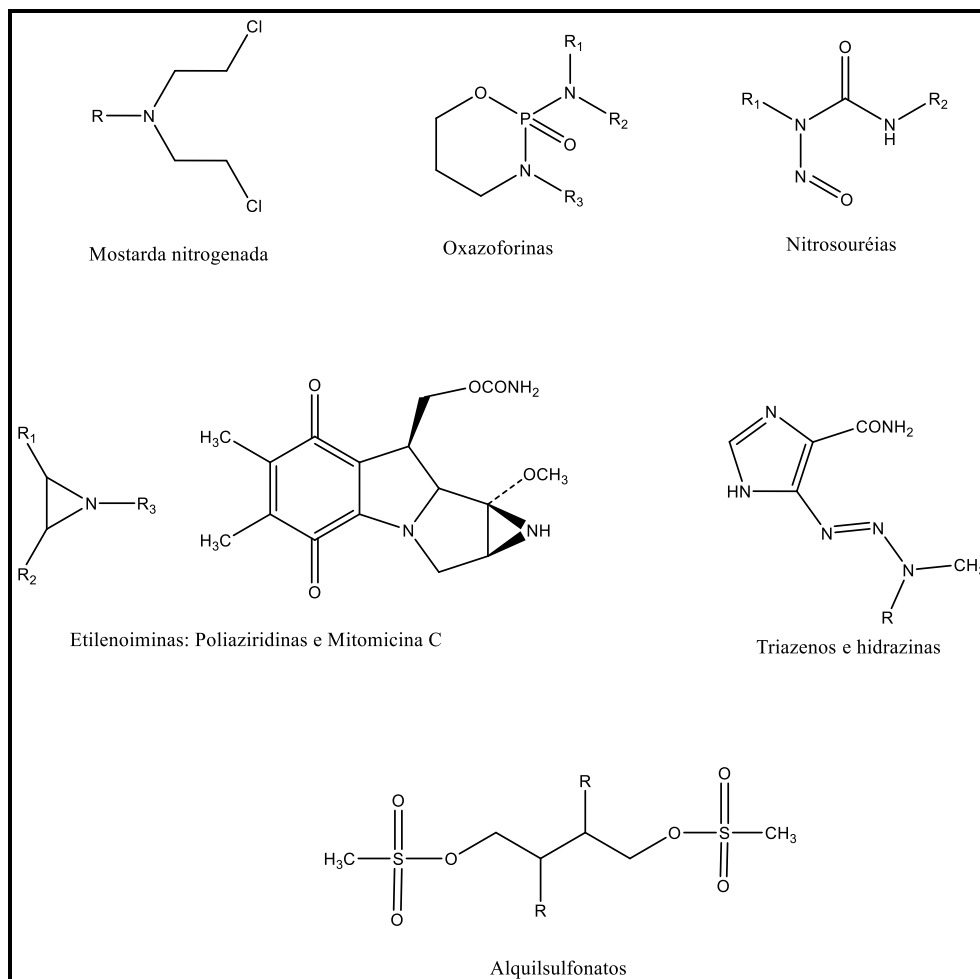


Figura 1.5: Estruturas das classes de agentes alquilantes.²⁵

²⁸ M. J. Maanen, C. J. Smeets, J. H. Beijnen, *Cancer Treat. Rev.* 26 (2000) 257-268.

²⁹ R. T. Dorr, G. T. Bowden, D. S. Alberts, J. D. Liddil, *Cancer Res.* 45 (1985) 3510-3516.

³⁰ H. Borowy-Borowski, R. Lipman, M. Tomasz, *Biochem.* 29 (1990) 2999-3006.

³¹ S. A. Schepartz, *Cancer Treat. Reports* 60 (1976) 647-649.

³² C. T. Gnewuch, G. Sosnovsky, *Chem. Rev.* 97 (1997) 829-1014.

³³ M. Ponti, R. L. Souhami, B. W. Fox, J. A. Hartley, *British J. of Cancer* 63 (1991) 743-747.

³⁴ E. S. Newlands, M. F. Stevens, S. R. Wedge, R. T. Wheelhouse, C. Brock, *Cancer Treat. Rev.* 23 (1997) 35-61.

³⁵ J. M. Erikson, D. J. Tweedie, J.M. Ducore, *Cancer Res.* 49 (1989) 127-133.

³⁶ L. Y. Fong, R. F. Bevill, J. C. Thurmon, P. N. Magee, *Carcinogenesis* 13 (1992) 2153-2159.

Tabela 1: Agentes alquilantes utilizados na clínica e suas aplicações²⁵.

Classe dos agentes alquilantes	Fármacos	Uso clínico
Mostardas nitrogenadas	Melfalano Clorambucil Bendamustina Estramustina	Tumores hematológicos; mielomas; câncer de ovário; tumores sólidos Câncer de próstata
Oxazoforinas	Ciclofosfamida Ifosfamida	Tumores hematológicos; tumores sólidos sarcomas; tumores sólidos
Etilenoiminas	Tiotepa Altretamina Mitomicina C	Câncer de ovário; mama; bexiga Câncer de ovário; pulmão; bexiga Câncer gastrointestinal; mama; bexiga
Nitrosouréias	Carmustina/Lomustina Nimustina Fotemustina Estreptozotocina	Linfoma; melanoma Tumor sólido Melanoma Câncer pancreático
Alquilsulfonatos	Bussulfano	Leucemia
Triazenos e hidrazinas	Dacarbazina Temozolomida Procarbazina	Melanoma; sarcoma; linfoma Glioma Linfoma; glioma

As mostardas nitrogenadas (bis(2-cloroetil)aminas) são os agentes alquilantes mais amplamente utilizados para o tratamento de diversos tipos de cânceres e são os mais ativos podendo-se destacar os fármacos Clorometina e Clorambucil, representados na Figura 1.6.³⁷ As questões de estabilidade, seletividade e resistência aos fármacos são comuns a esta classe de agentes alquilantes. Dessa forma, a alta reatividade e a meia-vida curta das mostardas nitrogenadas podem ser prejudiciais.³⁸

³⁷ S. R. Rajski, R. M. Williams, Chem. Rev. 98 (1998) 2723-2795.

³⁸ M. Millard, J. D. Gallagher, B. Z. Olenyuk, N. Neamati, J. Med. Chem. 56 (2013) 9170–9179.

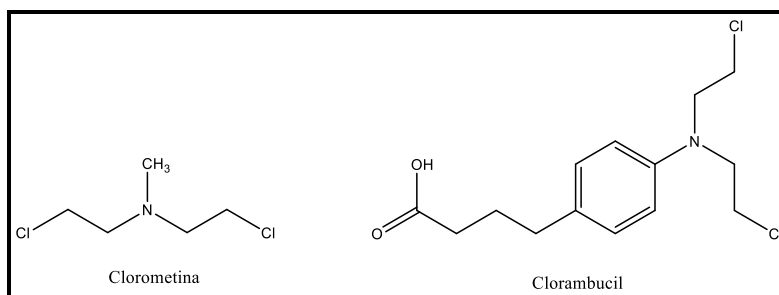


Figura 1.6: Estruturas das mostardas nitrogenadas aprovadas para uso clínico Clorometina e Clorambucil.³⁹

O mecanismo de ação, representado na Figura 1.7, das mostardas nitrogenadas envolve a alquilação do DNA, na posição 7 de duas guaninas, por meio da ligação cruzada. O início do ciclo ocorre antes de a mostarda nitrogenada entrar em contato com o DNA. Dentro do organismo ela sofre uma reação intramolecular formando o cátion aziridínico (eletrófilo). Esse intermediário é atacado pelo N7 da base nitrogenada guanina (nucleófilo). Ocorre então uma repetição no ciclo para se obter o produto final que é o DNA alquilado. Essa alquilação modifica a estrutura do DNA causando a morte da célula por apoptose.^{25,39}

³⁹ S. Karmakar, K. Purkait, S. Chatterjee, A. Mukherjee, Dalton Trans. 45 (2016) 359-3615.

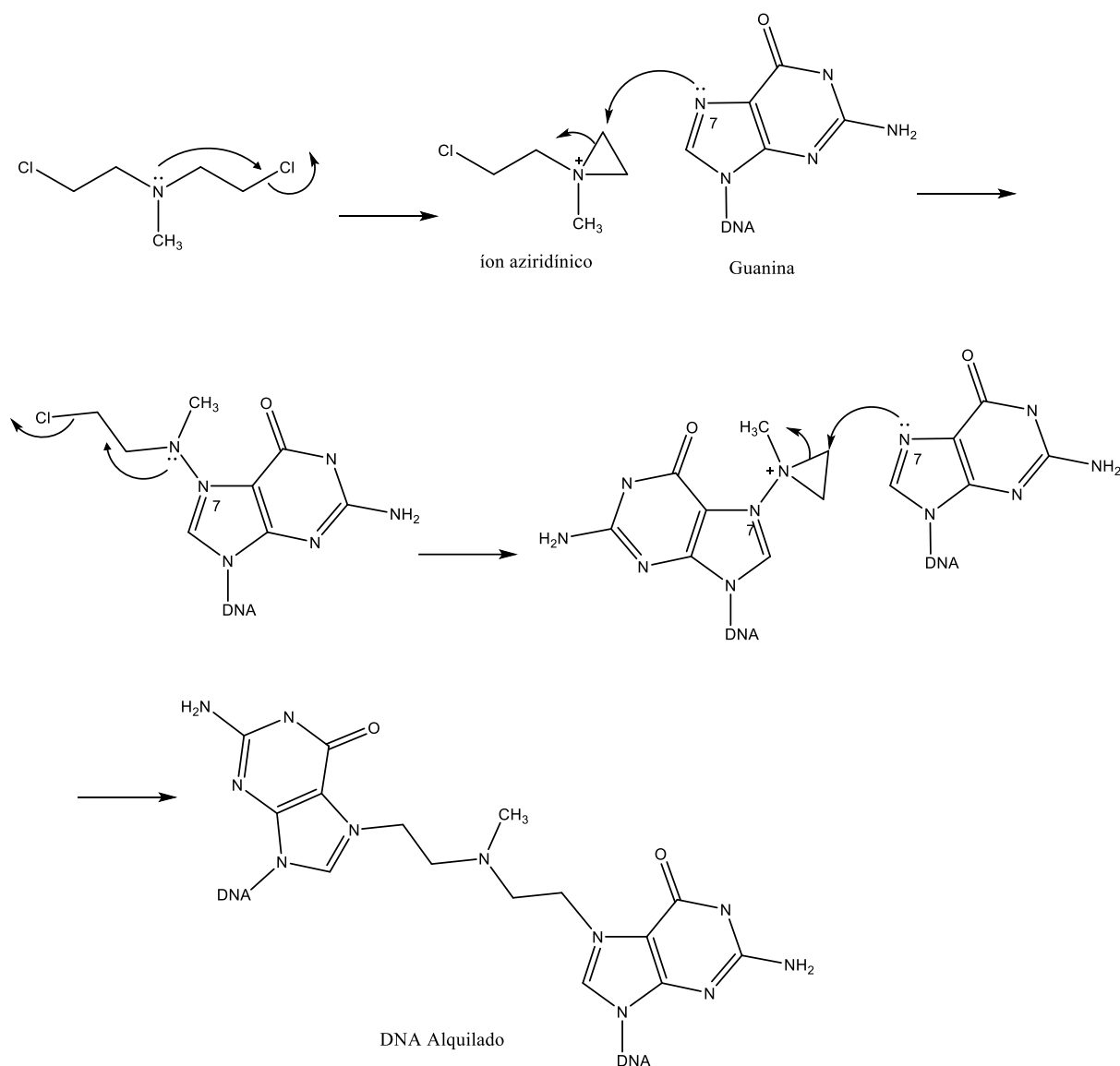


Figura 1.7: Mecanismo de ação da mostarda nitrogenada (Clorometina) com o DNA.^{25,39}

Esses derivados possuem um mecanismo de ação único que explica o recente interesse no desenvolvimento de novas classes de agentes alquilantes que poderiam ser usados em combinação com outros medicamentos antitumorais para aumentar a resposta tumoral na clínica.²⁵

1.4 Tiossemicarbazonas e a química medicinal

Tiossemicarbazonas são ligantes bases de Schiff, geralmente obtidos pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona derivada do nome do aldeído ou cetona de partida.⁴⁰ Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, vasta aplicação como

⁴⁰ J. S. Casas, M. S. Garcia-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.* 209 (2000) 197–261.

intermediários de sínteses, baixo custo de preparação e altos rendimentos.⁴¹ A estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC é mostrada na Figura 1.8.

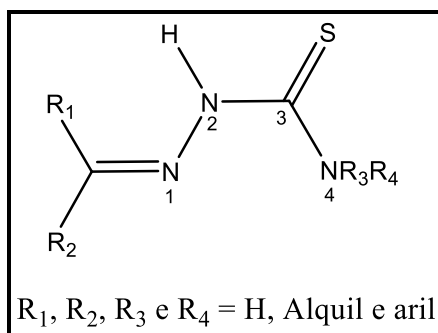


Figura 1.8: Representação estrutural genérica para tiossemicarbazonas.

Em 1974, Akbar Ali e Livingstone fizeram a primeira avaliação da química das tiossemicarbazonas junto com outros ligantes N-S-doadores⁴² e em seguida, Campbell, em 1975, publicou uma revisão sobre o mesmo assunto.⁴³

As tiossemicarbazonas são uma classe de compostos de considerável interesse em química medicinal devido as suas importantes aplicações biológicas, como agentes antitumorais⁴⁴, antimicrobianos⁴⁵, antivirais⁴⁶, antiprotozoários⁴⁷, dentre outros. Esses ligantes são conhecidos também, pelas suas excelentes propriedades para formarem complexos, comportando-se como agentes quelantes.⁴⁸

O composto 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (“Triapina”), que se encontra em fase clínica II, está sendo testado contra uma variedade de células tumorais⁴⁹ e a 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (“Tioacetazona”) (Figura 1.9), utilizada no tratamento de tuberculose⁵⁰, são bons exemplos de aplicações farmacológicas dessa classe de compostos.

⁴¹ X. Du, C. Gou, E. Hansell, P.S. Doyle, C.R. Caffrey, T.P. Holler, J. H. Mckerrow, F. E. Cohen, J. Med. Chem. 45 (2002) 2695–2707.

⁴² M. A. Ali, S. E. Livingstone, Coord. Chem. Rev. 13 (1974) 101–132.

⁴³ M. J. M. Campbell, Coord. Chem. Rev. 15 (1975) 279–319.

⁴⁴ J. A. Lessa, I. C. Mendes, P. R.O. da Silva, M. A. Soares, R. G. dos Santos, N. L. Speziali, N. C. Romeiro, E. J. Barreiro, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5671–5677.

⁴⁵ I. C. Mendes, J. P. Moreira, J. D. Ardisson, R. G. dos Santos, P. R. O. da Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 1454–1461.

⁴⁶ Y. Teitz, D. Ronen, A. Vansover, T. Stematsky, J. L. Riggs, Antiv. Res. 24(1994) 305–314.

⁴⁷ A. Merlino, D. Benitez, S. Chavez, J. Da Cunha, P. Hernández, L.W. Tinoco, N. E. Campillo, J. A. Páez, H. Cerecetto, M. González, Med. Chem. Commun. 1 (2010) 216–228.

⁴⁸ L. Antonini, F. Claudi, G. Cristalli, P. Franchetti, M. Grifantini, S. Martelli, J. Med. Chem. 24 (1981) 1181–1184.

⁴⁹ P. Genova, T. Varadinova, A.I. Matesanz, D. Marinova, P. Souza, Toxicoll. Appl. Pharm. 197 (2004) 107–112.

⁵⁰ R. P. Tripathi, N. Tewari, N. Dwivedi, V. K. Tiwari, Med. Res. Rev. 25 (2005) 93–131.

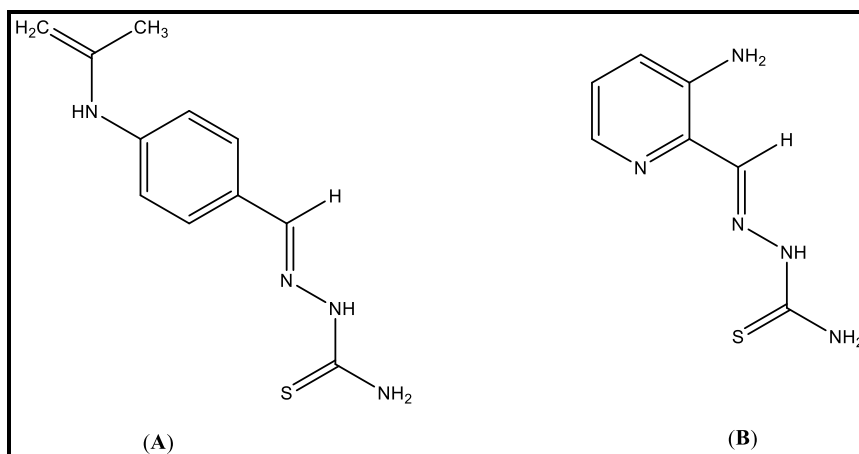


Figura 1.9: Representação das estruturas de: (A) 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (“Tioacetazona”); (B) 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (Triapina).

A atividade antitumoral das tiossemicarbazonas α -(N)-heterocíclicas tem sido atribuída a sua habilidade de inibição da Ribonucleosídeo Difosfato Redutase (RDR), uma enzima chave na biossíntese do DNA, a qual catalisa a conversão de ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos.⁵¹ Um aumento na atividade da enzima pode estar associado a doenças e em particular ao câncer. Dessa forma, a RDR constitui um alvo estratégico para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos antitumorais contendo esses ligantes.^{52,53,54}

O desenvolvimento da química “metal tiossemicarbazona”, foi objeto de revisões na literatura em 1985 por Padhye e Kauffman⁵⁵, em 1991 e 1993 por West e colaboradores^{56,57}, em 1999-2000 por Casas^{58,40}, em 2009 por Lobana e colaboradores⁵⁹, em 2012 por Dilworth e Hueting⁶⁰, em 2015 por Lobana⁶¹ e em 2016 por Mckenzie-Nickson e colaboradores⁶². Esses trabalhos têm descrito vários aspectos das tiossemicarbazonas, como a síntese dos complexos metálicos, propriedades espectroscópicas, estruturas cristalográficas e aplicações biológicas. Foi proposto que a coordenação ocorreria pelo átomo de enxofre e do nitrogênio azometínico, com a formação de um anel de cinco membros.

⁵¹ H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 41–39.

⁵² A. Popović-Bijelić, C. R. Kowol, M. E. S. Lind, J. Luo, F. Himmo, E. A. Enyedy, V. B. Arion, A. Gräslund, *J. Inorg Biochem.* 105 (2011) 1422–1431.

⁵³ F.A. Beckford, A. Brock, A. Gonzalez-Sarrías, N. P. Seeram, *J. Mol. Struct.* 1121 (2016) 156-166.

⁵⁴ P.J. Jansson, D. S. Kalinowski, D. J.R. Lane, Z. Kovacevic, N. A. Seebacher, L. Fouani, S. Sahni, A. M. Merlot, D. R. Richardso, *Pharm. Res.* 100 (2015) 255–260.

⁵⁵ S. Padhye, G. B. Kauffman, *Coord. Chem. Rev.* 63 (1985) 127–160.

⁵⁶ D. X. West, S. Padhye, P.B. Sonawane, *Struct. Bond. (Berlin, Ger.)* 76 (1991) 1–50.

⁵⁷ D. X. West, A. E. Liberta, S. Padhye, R. C. Chilkate, P. B. Sonawane, A. S. Kumbhar, R. G. Yerande, *Coord. Chem. Rev.* 123 (1993) 49–71.

⁵⁸ J. S. Casas, M. S. Garcia-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.* 193-195 (1999) 283–259.

⁵⁹ T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 977–1055.

⁶⁰ J. R. Dilworth, R. Hueting, *Inorg. Chim. Acta* 389 (2012) 3–15.

⁶¹ T. Lobana, *RSC Adv.* 5 (2015) 37231–37274.

⁶² S. Mckenzie-Nickson, A. I. Bush, K. J. Barnham, *Curr. Topics in Med. Chem.* 16 (2016) 3058-3068.

As propriedades biológicas das tiossemicarbazonas estão relacionadas à coordenação aos metais. Primeiro, a lipofilicidade, que controla a velocidade de entrada na célula, é modificada com a coordenação⁶³ e o complexo metálico pode ser mais ativo que o ligante livre.⁶⁴ O mecanismo de ação pode envolver a ligação ao metal *in vivo* ou o complexo metálico pode ser um veículo para a ativação do ligante como agente citotóxico. A coordenação aos metais pode levar a uma redução significativa da resistência celular.⁶⁵

Complexos com tiossemicarbazonas têm apresentado atividade antitumoral frente a diferentes linhagens tumorais. Dessa forma, o estudo desses compostos tem se tornado alvo de vários grupos de pesquisa na tentativa de se obter novos candidatos a fármacos antitumorais. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem estudado a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas variando os metais, como por exemplo, complexos de gálio(III)⁶⁶ com atividade frente a glioblastomas, complexos de platina(II) e paládio(II)⁶⁷ com atividade frente a tumor sólido e complexos de antimônio(III)⁶⁸ com atividade frente a leucemias. (Figura 1.10)

Tiossemicarbazonas contendo o grupo alquilante nitrogênio mostarda já foi descrito na literatura.⁶⁹ O mesmo grupo de pesquisa avaliou a atividade biológica de complexos de níquel contendo esses ligantes.⁷⁰

⁶³ N. Farrell, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 1–4.

⁶⁴ J. G. Silva, L. S. Azzolini, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2301–2305.

⁶⁵ G. L. Parrilha, R. P. Dias, W. R. Rocha, I. C. Mendes, D. Benítez, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, C. M. L. Melo, J. K. A. L. Neves, V.R.A. Pereira, H. Beraldo, *Polyhedron* 31 (2012) 614–621.

⁶⁶ I. C. Mendes, M. A. Soares, R. G dos Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2008) 1970-1877.

⁶⁷ K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C.M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 315-321.

⁶⁸ D.C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M. Souza-Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3904-3910.

⁶⁹ Sankaraperumal, A.; Karthikeyan, J.; Shetty, A.N.; *J. Struct. Chem.* 53 (2012) 932-937.

⁷⁰ Sankaraperumal, A.; Karthikeyan, J.; Shetty, A.N.; Lakshmisundaram, R.; *Polyhedron* 50 (2013) 264-269.

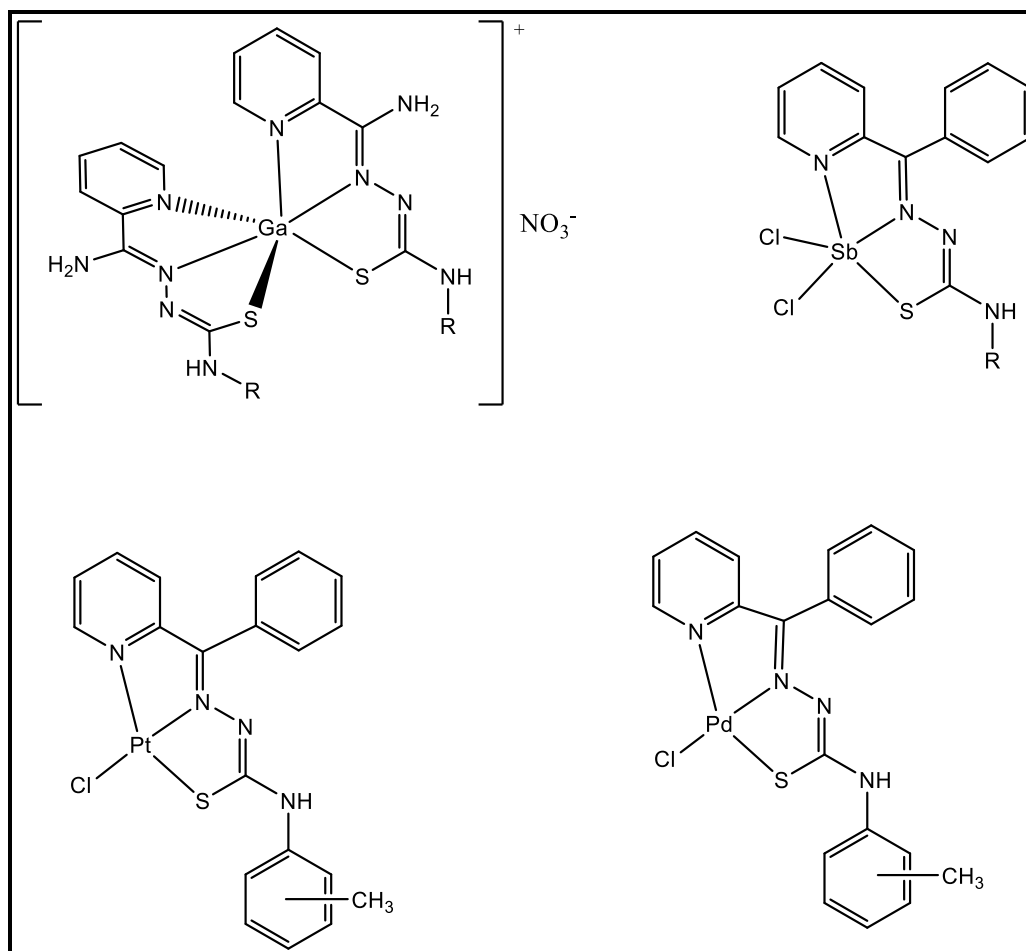


Figura 1.10: Estruturas dos complexos com tiossemicarbazonas com atividade antitumoral.^{66,67,68}

1.5 Hidrazonas e a química medicinal

Hidrazonas são bases de Schiff caracterizadas pela presença do grupo $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ (Figura 1.11 A). A obtenção desses compostos geralmente ocorre pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos, sendo comumente necessária a utilização de catálise ácida.⁷¹ Esses ligantes têm atraído a atenção de pesquisadores devido às suas diversas aplicações biológicas.⁷² Dentre estas, podemos citar

⁷¹ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. Da Costa, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 1247–1257.

⁷² R. Anbazhagan, K. R. Sankaran, Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biom. Spectr. 135 (2015) 984–993.

as atividades antitumoral^{73,74}, antituberculose⁷⁵, antimicrobiana⁷⁶, anti-inflamatória^{77,78}, neuroprotetiva⁷⁹ e anticonvulsivante⁸⁰.

Os complexos metálicos contendo esses ligantes também apresentam um grande interesse científico na tentativa de se obter novos candidatos a fármacos.

As hidrazonas derivadas de compostos acil ou aroil são mais flexíveis e versáteis, pois possuem um sítio doador adicional C=O (Figura 1.11 B). A presença de um anel piridínico α -(N) à ligação imínica, como por exemplo os derivados 2-acetilpiridina (Figura 1.11 C), possibilita a coordenação na forma tridentada. Dessa forma, esse sítio adicional torna as hidrazonas bons agentes quelantes hábeis a formar complexos com diferentes metais como rutênio(II)⁸¹, cobre(II)⁸², cádmio(II) e zinco(II).⁸³

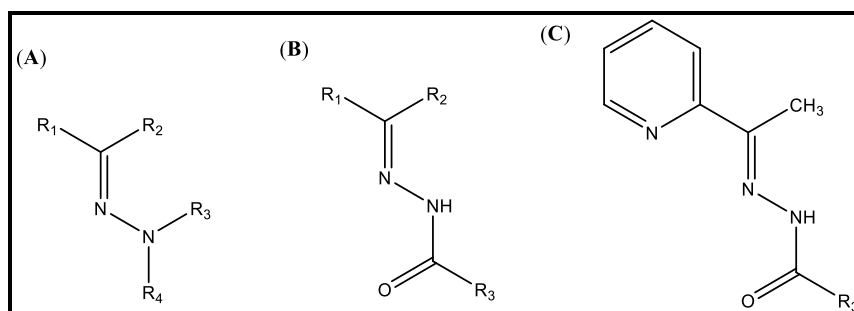


Figura 1.11: Estrutura geral das hidrazonas (A); de acil hidrazonas (B); do derivado 2-acetilpiridinahidrazona (C).

Nosso grupo de pesquisa investiga a atividade biológica de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e seus complexos com vários metais. A atividade citotóxica de

⁷³ J. Benites, J. A. Valderrama, F. Rivera, L. Rojo, N. Campos, M. Pedro, M. S. J. Nascimento, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 862–868.

⁷⁴ P. Dandawate, E. Khan, S. Padhye, H. Gaba, S. Sinha, J. Deshpande, K. V. Swamy, M. Khetmalas, A. Ahmad, F. H. Sarkar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3104–3108.

⁷⁵ A. Mahajan, L. Kremer, S. Louw, Y. Guéradel, K. Chibale, C. Biot, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 2866–2868.

⁷⁶ B. Tian, M. He, S. Tang, I. Hewlett, Z. Tan, J. Li, Y. Jin, M. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2162–2167.

⁷⁷ S. V. Bhandari, K. G. Bothara, M. K. Raut, A. A. Patil, A. P. Sarkate, V. J. Mokale, *Bioorg Med Chem* 16 (2008) 1822-1831.

⁷⁸ C.M Moldovan, O. Oniga, A. Pârnu, B. Tiperciuc, P. Verite, A. Pîrnașu, *Eur J Med Chem* 46 (2011)526-534.

⁷⁹ U. Salgin-Gökşen, N. Gökhan-Kelekçi, S. Yabanoglu-Çiftçi, K. Yelekçi, G. Uçar, *J. Neural Transm.* 120 (2013) 883-891.

⁸⁰ C. M. Leal, S. L. Pereira, A. E. Kümmerle, D. M. Leal, R. Tesch, C.M.R. de Sant’Anna, C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro, R. T. Sudo, G. Zapata-Sudo, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 49-57.

⁸¹ R. Manikandan, P. Viswanathamurthi, M. Muthukumar, *Spectrochim. Acta Part A* 83 (2011) 297–303.

⁸² S. Banerjee, S. Mondal, W. Chakraborty, S. Sen, R. Gachhui, R. J. Butcher, A. M. Z. Slawin, C. Mandal, S. Mitra, *Polyhedron* 28 (2009) 2785–2793.

⁸³H. Q. Chang, L. Jia, J. Xua, Z. Q. Xua, R. H. Chenb, W. N. Wu, H. Y. Bie, T. F Zhu, T. L. Ma, Y. Wang, *Inorg. Chem. Comm.* 57 (2015) 8–10.

complexos de gálio(III)⁸⁴ frente a linhagens de gliomas e a atividade de complexos de rênio(I)⁸⁵ frente a linhagens de câncer de pulmão foram avaliadas. As atividades antimicrobianas de complexos de cobre(II)⁸⁶ e estanho (IV)⁸⁷ também foram estudadas. (Figura 1.12)

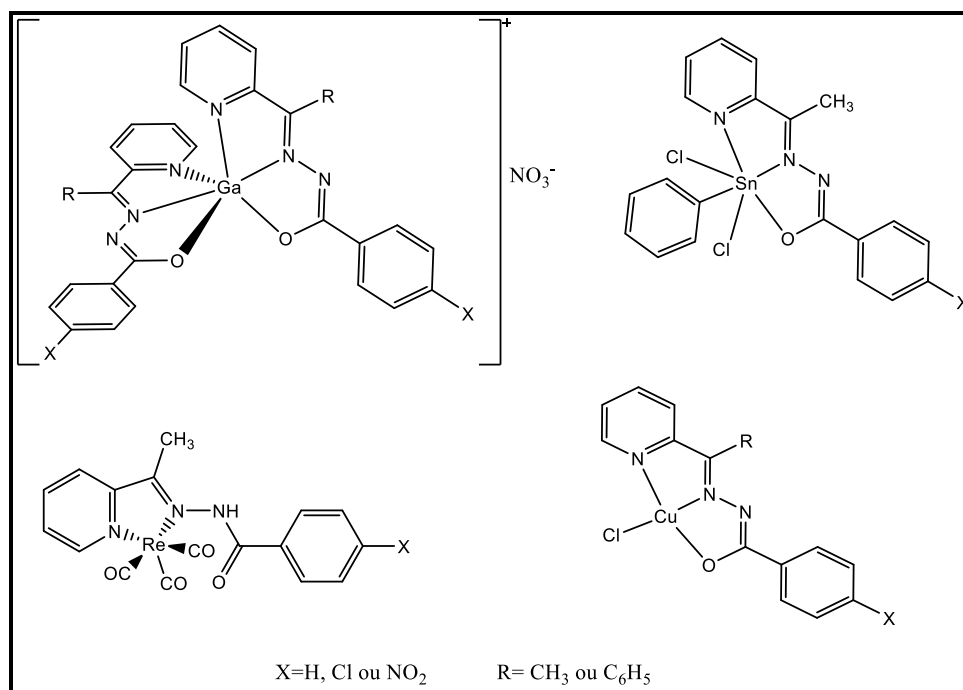


Figura 1.12: Estruturas dos complexos com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina.^{84,85,86,87}

1.6 Chalconas

Chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) são compostos precursores de flavonóides e isoflavonóides, constituídas por dois grupos aromáticos ligados entre si por uma carbonila α,β -insaturada (Figura 1.13). O termo “chalcona” foi dado por Kostanecki e Tomar em 1899, por meio de um trabalho pioneiro na síntese de compostos naturais cromóforos.⁸⁸

⁸⁴ 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) 163–172.

⁸⁵ C. V. Garcia, G. L. Parrilha, B. L. Rodrigues, S. F. Teixeira, R. A. Azevedo, A. K. Ferreira, H. Beraldo, *New J. Chem.* 40 (2016) 7379–7387.

⁸⁶ A. A. R. Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron* 38 (2012) 285–290.

⁸⁷ A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21(2010) 1247-1257.

⁸⁸ D. K. Mahapatra, V. Asati, S. K. Bharti, *Eur. J. Med. Chem.* 92 (2015) 839–865.

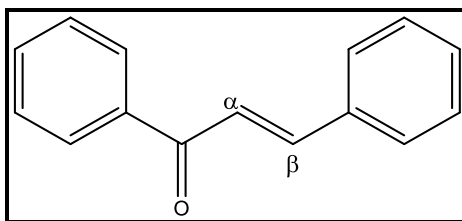


Figura 1.13: Estrutura genérica das chalconas.

As chalconas podem ser sintetizadas através de uma reação de condensação aldólica. Esta reação ocorre entre aldeídos e cetonas aromáticos em solventes orgânicos a temperatura ambiente, sendo comumente catalisada por uma base forte como por exemplo, o hidróxido de sódio (NaOH).⁸⁹

Essa família de compostos tem atraído grande interesse dos pesquisadores não apenas devido as perspectivas sintéticas e biossintéticas, mas também devido a sua ampla atividade biológica. A presença da dupla ligação na conjugação com a função carbonílica parece ser a responsável pela atividade biológica desses compostos.⁹⁰ As chalconas são aplicadas para fins terapêuticos há muitos anos por meio do uso de plantas para o tratamento de doenças como diabetes e inflamações.⁹¹

Compostos derivados de chalconas têm sido aprovados para uso clínico, como exemplo, podemos citar a Metochalcona (Figura 1.14 A), com atividade colerética e a Sofalcona (Figura 1.14 B) com atividade antiulcerosa e mucoprotetora.⁹²

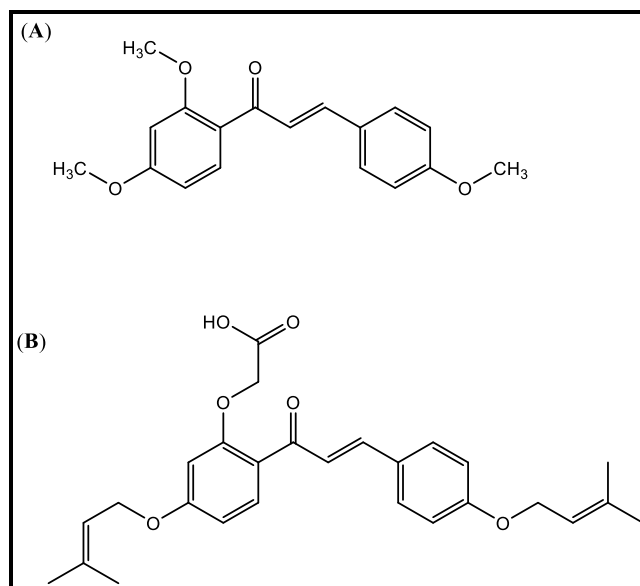


Figura 1.14: Estruturas das chalconas utilizadas clinicamente:

(A) Metochalcona e (B) Sofalcona.⁹¹

⁸⁹ S. Eddarir, N. Cotelle, Y. Bakkour, C. Rolando, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 5359–5363.

⁹⁰ P. Singh, A. Anand, V. Kuma, *Eur. J. Med. Chem.* 85 (2014) 758-777.

⁹¹ C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, Z. Miao, *Chem. Rev.* 117 (2017) 7762–7810.

⁹² N.K. Sahu, S.S. Balbhadra, J. Choudhary, D.V. Kohli, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 209-225.

Dentre as diferentes atividades biológicas das chalconas relatadas na literatura, podemos destacar as atividades antituberculose⁹³, antimalárica⁹⁴, antidiabética⁹⁵, antibacteriana⁹⁶, antitumoral^{97,98}, anti-inflamatória⁹⁹, antiviral¹⁰⁰, antiprotozoária^{101,102}. No entanto, os mecanismos de ação para as atividades biológicas abrangentes das chalconas ainda não são bem compreendidos. Assim, vários estudos têm sido relatados na literatura na tentativa de se compreender o modo de ação desses compostos. Um dos alvos propostos para esta classe de compostos seria a tiorredoxina redutase (TrxR).

Nesse contexto, Zhang e colaboradores¹⁰³ avaliaram a atividade citotóxica e o mecanismo de ação em diferentes linhagens celulares de análogos de Xanthohumol. O composto mais promissor da série sintetizada apresentou significativa atividade frente à linhagem tumoral HeLa (câncer de útero) com IC₅₀=1,4μM, cerca de 30 vezes mais ativo que o controle Xanthohumol. O composto inibiu seletivamente a tiorredoxina redutase (TrxR) e induziu a apoptose. A estrutura do composto está representada na Figura 1.15 A. TrxR também foi avaliada como possível alvo para chalconas com atividade citotóxica em um trabalho publicado por Gan e colaboradores.¹⁰⁴ (Figura 1.15 B)

⁹³ T. A. Choi, R. Czerwonka, W. Fröhner, M. P. Krahl, K. R. Reddy, S. G. Franzblau, H. J. Knölker, *Chem. Med. Chem.* 1 (2006) 812-815.

⁹⁴ N. Yadav, S.K. Dixit, A. Bhattacharya, L.C. Mishra, M. Sharma, S.K. Awasthi, V.K. Bhasin, *Chem. Biol. Drug Des.* 80 (2012) 340-347.

⁹⁵ D. K. Mahapatra, V. Asati, S. K. Bharti, *Eur. J. Med. Chem.* 92 (2015) 839-865.

⁹⁶ R. Prasath, P. Bhavana, Seik Weng Ng, Edward R.T. Tiekink, *J. Organomet. Chem.* 726 (2013) 62-70.

⁹⁷ W. J. Kang, D. H. Li, T. Han, L. Sun, Y. B. Fu, C. M. Sai, Z. L. Li, H. M. Hua, *Fitoterapia* 112 (2016) 222–228.

⁹⁸ B. Zhou, P. Jiang, J. Lu, C. Xing, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 349 (2016) 1–14.

⁹⁹ M. Funakoshi-Tago, K. Okamoto, R. Izumi, K. Tago, K. Yanagisawa, Y. Narukawa, F. Kiuchi, T. Kasahara, H. Tamura, *Int. Immunopharmacol.* 25 (2015) 189–198.

¹⁰⁰ H. Sharma, S. Patil, T. W. Sanchez, N. Neamati, R. F. Schinazi, J. K. Buolamwini, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 2030–2045.

¹⁰¹ M.L. Bello, L.D. Chiaradia, L.R.S. Dias, L.K. Pacheco, T.R. Stump, A. Mascarello, M. Steindel, R.A. Yunes, H.C. Castro, R.J. Nunes, C.R. Rodrigues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2011) 5046-5052.

¹⁰² A. Anthwal, U.C. Rajesh, M.S.M. Rawat, B. Kushwaha, J.P. Maikhuri, V.L. Sharma, G. Gupta, D.S. Rawat, *Eur. J. Med. Chem.* 79 (2014) 89-94.

¹⁰³ B. Zhang, D. Duan, C. Ge, J. Yao, Y. Liu, X. Li, J. Fang, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 1795–1805.

¹⁰⁴ F. F. Gan, K. K. Kaminska, H. Yang, C. Y. Liew, P. C. Leow, C. L. So, L. N. Tu, A. Roy, C. W. Yap, T. S. Kang, W. K. Chui, E. H. Chew, *Antioxid. Redox Signaling* 19 (2013) 1149–1165.

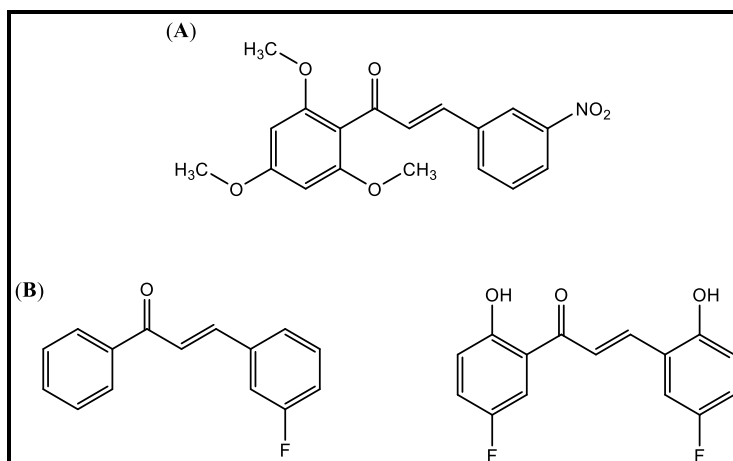


Figura 1.15: Estruturas de: (A) análogo de Xanthohumol; (B) compostos sintetizados por Gan e colaboradores.⁹¹

A pronunciada atividade citotóxica de derivados de chalconas resultou em várias patentes: (A) WO2013054998 A1¹⁰⁵, (B) WO2012017454 A1¹⁰⁶ e (C) EP 2601943 A1¹⁰⁷. As estruturas desses compostos estão representadas na Figura 1.16.

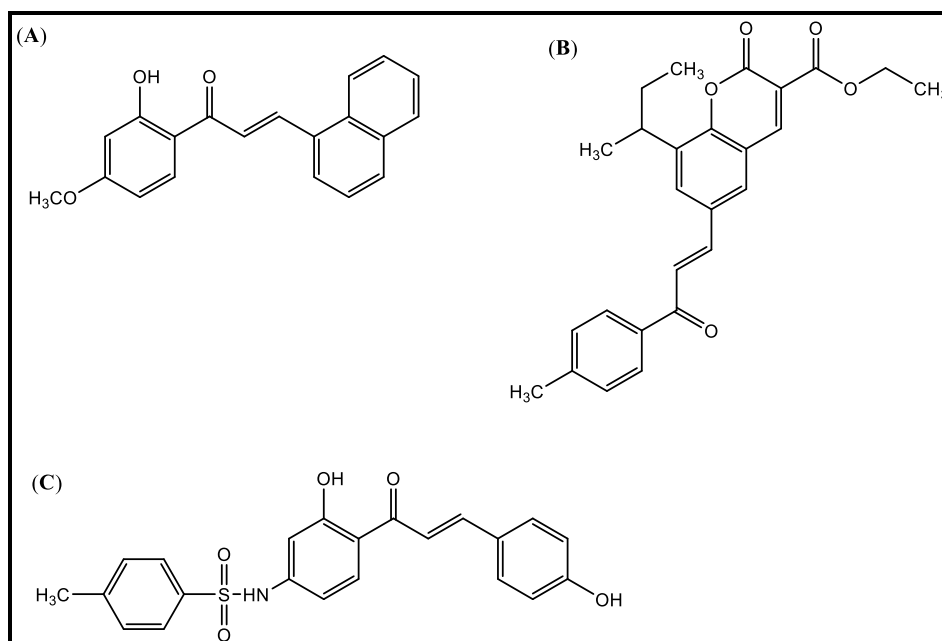


Figura 1.16: Estruturas das chalconas (A) WO2013054998 A1; (B) WO2012017454 A1; (C) EP 2601943 A1.

¹⁰⁵ Konkuk University Industrial Cooperation Corporation assignee. Patent WO2013054998 A1. (2013).

¹⁰⁶ Council of Scientific and Industrial Research assignee. Patent WO2012017454 A1. (2012).

¹⁰⁷ Seoul National University Industry Foundation and Industry-Academic Cooperation Foundation assignee. Patent EP 2601943 A1. (2013).

1.7 Platina: atividade farmacológica e uso na medicina

O mais importante fármaco em uso clínico contendo platina é a cisplatina. Esse composto é um dos mais utilizados no tratamento de câncer em todo o mundo. Porém, somente 1% ou menos do fármaco administrado, chega ao alvo biológico e se liga ao DNA causando a morte da célula por apoptose. O restante reage com proteínas e biomoléculas, especialmente as que contem enxofre, como por exemplo a albumina (HSA), presente no sangue, formando compostos do tipo Pt-S(tiol). Essa ligação indiscriminada causa os efeitos colaterais da cisplatina, como a nefrotoxicidade.¹⁰⁸

Depois da descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, começou-se uma busca pelo mecanismo de ação desse fármaco. O primeiro ponto foi saber qual o alvo biológico, pois há vários componentes celulares que podem reagir com a cisplatina. Uma vez que o DNA foi estabelecido como principal alvo do fármaco nas células, os detalhes da interação dessa ligação foram investigados para se determinar qual o tipo de aduto pode ser formado com o DNA.¹⁰⁹

Os principais tipos de adutos são os monofuncionais (cada átomo de platina faz apenas uma ligação com o DNA) e os bifuncionais (cada átomo de platina se liga a duas posições do DNA). Esse tipo de ligação pode ocorrer de três formas: (1) intrafita: quando as duas ligações ocorrem na mesma fita do DNA; (2) interfitas: quando cada ligação é feita em uma fita diferente do DNA; (3) intermolecular: quando uma ligação da platina é feita com o DNA e a outra com uma proteína ou aminoácido. Para a cisplatina, o aduto formado em maior quantidade é o que corresponde à ligação intrafita (Figura 1.17), envolvendo bases guaninas adjacentes, o que sugere ser a formação desse aduto o maior responsável pela sua atividade anticancerígena, uma vez que provoca lesões mais difíceis de serem reparadas.¹¹⁰

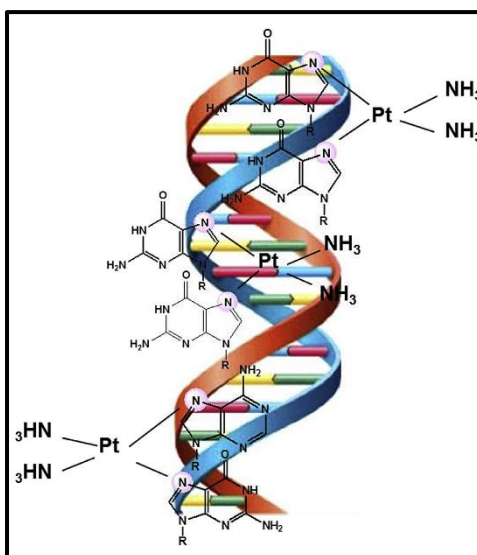


Figura 1.17: Modo de coordenação da cisplatina ao DNA.

(Figura adaptada: T. Lazarevic, *et al*¹⁶)

¹⁰⁸ N. Graf, S. J. Lippard, *Adv. Drug Del. Rev.* 64 (2012) 993–1004.

¹⁰⁹ E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2467–2498.

¹¹⁰ A. P. S. Fontes, E. T. César, H. Beraldo, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* 6 (2005) 13–18.

A habilidade da cisplatina em se ligar ao DNA e distorcer sua estrutura pode interferir no funcionamento normal desse componente celular tão importante. A replicação do DNA e a transcrição são essenciais para a divisão celular e a produção da proteína. Dessa forma, qualquer ruptura nesse processo, pode ser citotóxico. Por essas razões, os efeitos da função da “platinação” no DNA, tem sido muito estudado, com o objetivo de entender melhor a atividade biológica desse fármaco.¹⁰⁹

O sucesso terapêutico da cisplatina impulsionou os pesquisadores a sintetizar novos compostos à base do metal. A segunda geração de complexos de platina(II), a carboplatina (aprovada em 1993) e a oxalapatina (aprovada em 2002), já são utilizadas na clínica no tratamento de diversos tumores.¹¹¹ Outros compostos à base de platina que estão em estudos clínicos são a nedaplatina (aprovada para uso no Japão), a lobaplatina (aprovada para uso na China) e a heptaplatina (aprovada para uso na Coreia) (Figura 1.18).

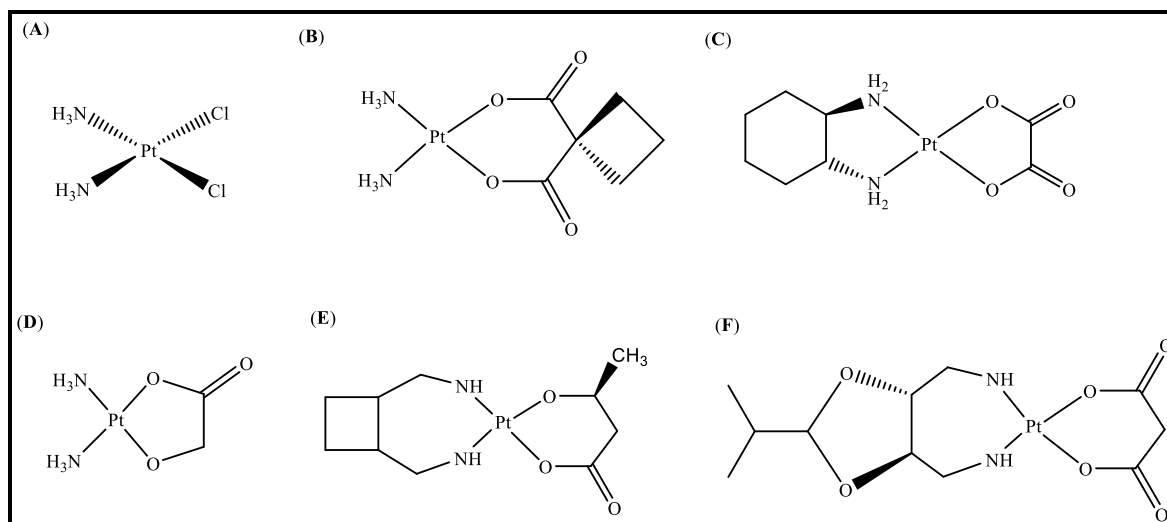


Figura 1.18: Representação estrutural dos compostos de platina(II) utilizados no tratamento do câncer: (A) cisplatina; (B) carboplatina; (C) oxalapatina; (D) nedaplatina; (E) lobaplatina.; (F) heptaplatina.¹¹²

No entanto, a terapia com compostos de platina apresenta problemas, como a ocorrência de sérios efeitos colaterais e o aparecimento de resistência, o que dificulta seu uso clínico.¹¹³

Dessa forma, grupos de pesquisa, têm-se dedicado ao estudo de novos complexos de platina(II) não convencionais e que possuem modo de ação diferente, que possam ser utilizados em tumores

¹¹¹ D. Wang, S.J. Lippard, Nat. Rev. Drug Discov. 4 (2005) 307-320.

¹¹² J.J. Wilson, S.J. Lippard, Chem. Rev. 114 (2014) 4470–4495.

¹¹³ R. Rubbiani, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, A. Kitanovic, L. A. Onambele, M. Stefanopoulou, Y. Geldmacher, W. S. Sheldrick, G. Wolber, A. Prokop, S. Wöfl, I. Ott, J. Med. Chem. 53 (2010) 8608–8618.

resistentes à cisplatina.^{114,115} A coordenação de vários ligantes orgânicos à platina(II) como, piridina¹¹⁶, bipyridina¹¹⁷, terpiridina¹¹⁸, naftaleno¹¹⁹, fenantrolina¹²⁰, dentre outros, tem sido uma estratégia bastante utilizada nessa busca de novos fármacos a base do metal. Na Figura 1.19 estão representados alguns compostos de platina com variação nos ligantes.

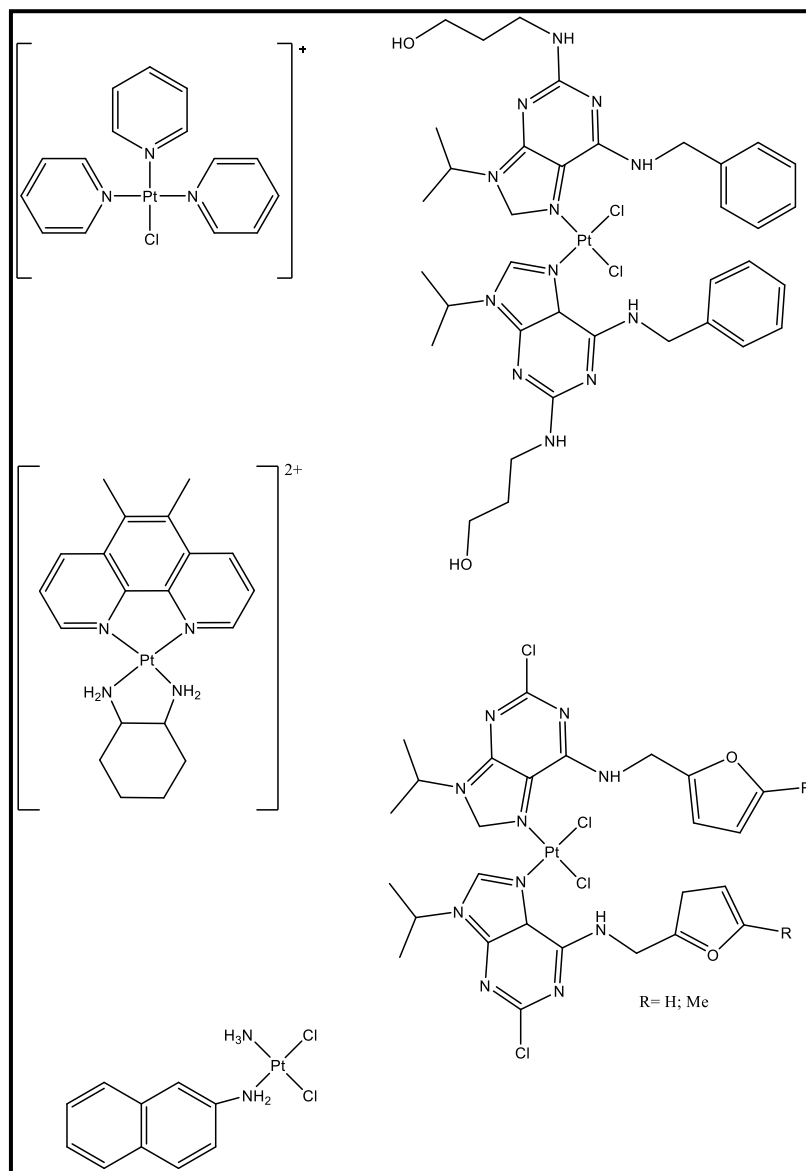


Figura 1.19: Compostos de platina(II) com ligantes variados^{9,16, 119}

¹¹⁴ R. Krikavová, L. Hanousková, Z. Dvorák, Z. Trávníček, Polyhedron 90 (2015)7–17.

¹¹⁵ O. Novakova, B. Liskova, J. Vystřilova, T. Suchankova, O. Vrana, P. Starha, Z. Trávníček, V. Brabec, Eur. J. Med. Chem. 78 (2014) 54–64.

¹¹⁶ R. Mohammadi, R. Yousefi, M.D. Aseman, S.M. Nabavizadeh, M. Rashidi, Med. Chem. 15 (2015) 107-114.

¹¹⁷ D.A.K. Vezzu, Q. Lu, Y. Chen, S. Huo, J. Inorg. Biochem. 134 (2014) 49-56.

¹¹⁸ W. Chu, Y. Wang, S. Liu, X. Yang, S. Wanga, S. Li, G. Zhou, X. Qin, C. Zhou, J. Zhang, Synthesis, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 5187-5191.

¹¹⁹ E. Gabano, S. Gama, F. Mendes, M.B. Gariboldi, E. Monti, S. Bombard, S. Bianco, M. Ravera, J. Biol. Inorg. Chem. 18 (2013) 791-801.

¹²⁰ S. Kemp, N.J. Wheate, D.P. Buck, M. Nikac, J.G. Collins, J.R. Aldrich-Wright, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 1049-1058.

1.8 Paládio: atividade farmacológica e uso na medicina

A similaridade entre a química de coordenação dos metais platina(II) e paládio(II) tem despertado o interesse de pesquisadores na busca por novos complexos de paládio(II) como possíveis candidatos a fármacos antitumorais, na esperança de que esses compostos possuam atividade semelhante aos compostos de platina.¹²¹

No entanto, complexos de platina(II) são termodinâmica e cineticamente mais estável que o paládio(II).^{122,123} Os complexos de paládio(II) se dissociam rapidamente em solução, 10⁵ vezes mais rápido que compostos de platina(II), formando espécies muito reativas.¹²⁴ Devido a esta troca rápida, os derivados de paládio(II) não mantêm a sua integridade estrutural em fluidos biológicos durante o tempo suficiente para atingir os alvos farmacológicos. Pesquisas publicadas na literatura mostraram que a escolha adequada dos ligantes é crucial, pois eles desempenham um papel importante na modificação da reatividade e lipofilicidade, na estabilização de estados de oxidação e na transmissão de inércia de substituição.¹²⁵

Com isso, o uso do metal na medicina é limitado devido a sua alta toxicidade. Comparado com o cisplatina, o correspondente cispaládio, [Pd(NH₃)₂Cl₂], Figura 1.20 A, não apresenta atividade antitumoral, por sofrer hidrólise rapidamente e dessa forma interagir com outras moléculas biológicas e não com o alvo que é o DNA.¹²⁶

Na tentativa de melhorar a atividade antitumoral dos complexos de paládio(II), pesquisadores utilizam como estratégia a introdução de ligantes volumosos e fortemente coordenantes visando diminuir a alta reatividade desses compostos. Tusek-Bozic e colaboradores¹²⁷ sintetizaram em 1991 um dos primeiros complexos de Pd(II) contendo quinolina substituída com atividade antitumoral melhorada, estrutura representada na Figura 1.20 B.

Em 2013, Tanaka e colaboradores¹²⁸ sintetizaram um complexo de paládio(II) com glicoconjugados e testaram a atividade citotóxica frente ao câncer gástrico em linhagens tumorais sensíveis e resistentes à cisplatina. O complexo, Figura 1.20 C, apresentou atividade frente à linhagem sensível à cisplatina e induziu a apoptose. Além disso, o complexo foi capaz de superar à resistência cruzada a cisplatina *in vitro* e *in vivo*.

¹²¹ A.R. Kapdi, I.J.S. Fairlamb, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 4751-4777.

¹²² N. N. Stone, P.G. Stock, Eur. Urol. 41 (2002) 427-433.

¹²³ L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X. H. Wang, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 50 (2001) 605-614.

¹²⁴ A. S. Abu-Surrah, K. A. Abu Safieh, I. M. Ahmad, Maher Y. Abdalla, M. T. Ayoub, A. K. Qaroush, A. M. Abu-Mahtheieh, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 471-475.

¹²⁵ Z. D. Bugarcic, J. Bogojeski, R.van Eldik, Coord. Chem. Rev. 292 (2015) 91-106.

¹²⁶ A. S. Abu-Surrah, H. H. Al-Sa'doni, M. Y. Abdalla, Cancer Therapy 6 (2008)1-10.

¹²⁷ Lj Tusek-Bozic, I. Matijasic, G. Bocelli, G. Calestani, A. Furlani, V. Scarzia, A. Papaioannou, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 0 (1991) 195-201.

¹²⁸ M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, H. Ohi, K. Kawamoto, T. Shibahara, T. Mizoshita, Y. Mori, S. Tanida, T. Kamiya, T. Joh, BMC Cancer 13 (2013) 237-245.

Recentemente Darabi e colaboradores¹²⁹ sintetizaram complexos de paládio(II) com ligante derivado de terpiridina (Figura 1.20 **D**). A atividade citotóxica foi avaliada frente a cinco linhagens tumorais: mama (MCF-7), pulmão (A-549), cólon (HT-29), leucemia (K562) e hepatocelular (Hep-G2). Os resultados mostraram que o complexo apresenta significativa atividade frente a maioria das linhagens tumorais testadas quando comparado à cisplatina, com exceção da linhagem tumoral Hep-G2 em que o composto apresentou atividade na mesma ordem de grandeza do fármaco controle. O complexo interage com o DNA e se liga a albumina. Os autores sugeriram ainda que o complexo apresenta menor toxicidade aos rins que a cisplatina.

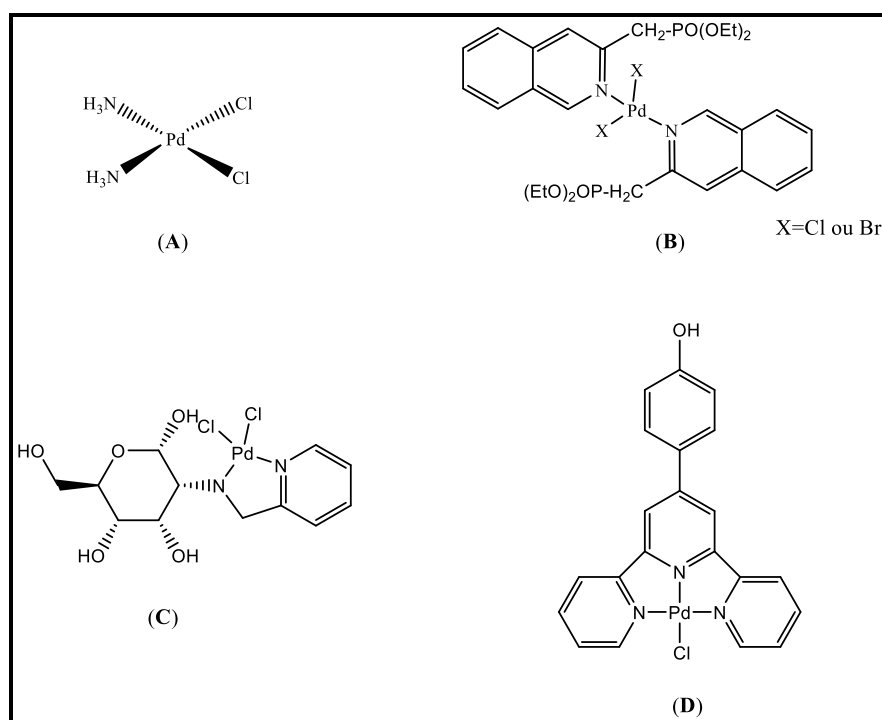


Figura 1.20: Complexos de paládio(II) como agentes antitumorais: **(A)** cispaládio; **(B)** complexo de paládio(II) com ligantes derivados de quinolina; **(C)** complexo de paládio(II) com ligantes glicoconjugados; **(D)** complexo de paládio(II) com ligante derivado de terpiridina.¹⁶

Todas essas pesquisas podem contribuir para um melhor entendimento desses complexos nos sistemas biológicos e para melhorar sua atividade. O conhecimento do mecanismo de reação dos compostos de paládio sob condições biológicas é a base para o desenvolvimento de novos candidatos a metalofármacos e do surgimento de novos possíveis procedimentos no tratamento.¹²⁵

¹²⁹ F. Darabi, H. Hadadzadeh, J. Simpson, A. Shahpiri, New J. Chem. 40 (2016) 9081-9097.

1.9 Ouro: atividade farmacológica e uso na medicina

O uso do ouro na química medicinal é relatado desde os tempos remotos da civilização. O primeiro relato da utilização desses compostos foi pelos Chineses em torno de 2500 a.C. Na Europa Medieval, alquimistas possuíam numerosas fórmulas para o que seria o elixir da vida: o "ouro potável".¹³⁰ Nos séculos XVII e XIX, o ouro foi usado no tratamento de febre e sífilis, respectivamente. Em 1890 marcou-se o início do uso do ouro na medicina moderna quando Robert Koch descobriu que o composto, $K[Au(CN)_2]$, apresentava atividade antitubercular *in vitro*. O uso de ouro na terapia da tuberculose foi introduzido em 1920 e permaneceu até sua substituição pelos antibióticos. A primeira aplicação foi no tratamento de tuberculose pulmonar. No entanto, os compostos de ouro se revelaram ineficazes *in vivo*, mas esses estudos levaram Jacque Forestier a utilizar os compostos de ouro para o tratamento de artrite reumatóide (AR) em 1935.¹³¹ O uso de ouro na medicina, especialmente no tratamento de artrite reumatóide, é chamado de crisoterapia.¹³² Os primeiros compostos de ouro utilizados para o tratamento de AR foram os tiolatos de ouro(I), Miocrisina e Solganol, que não apresentaram uma boa eficácia terapêutica, impulsionando a busca por fármacos com melhor perfil farmacocinético e menos efeitos indesejáveis. Em 1985, um novo composto ("auranofina") foi introduzido como fármaco oral.¹³⁰ (Figura 1.21).

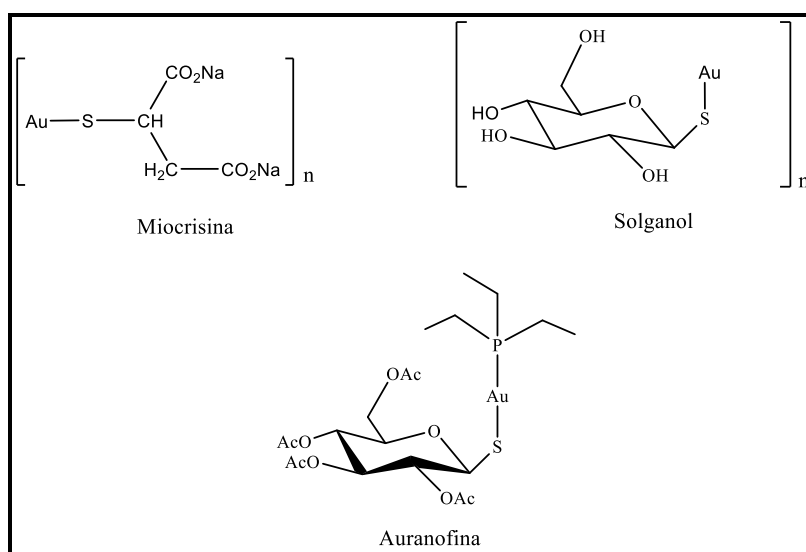


Figura 1.21: Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da artrite reumatóide.¹³³

Ouro é um metal encontrado no grupo 11 da tabela periódica, com número atômico 97 e pode existir em vários estados de oxidação (-I a +V). No entanto, somente os estados de oxidação (0), (I) e (III) são estáveis em solução aquosa e, portanto, em ambientes biológicos.¹³⁰ Ouro(I) possui

¹³⁰ S. P. Fricker, *Trans. Met. Chem.* 21 (1996) 377–383.

¹³¹ A. S. Thakor, J. Jokerst, C. Zaveleta, T. F. Massoud, S. S. Gambhir, *Nano Lett.* 11 (2011) 4029–4036.

¹³² E. R. T. Tiekink, *Critical Rev. Onc. Hem.* 42 (2002) 225–248.

¹³³ S. Ahmad, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 231–243.

configuração eletrônica d^{10} e tende a formar complexos com geometria linear, enquanto complexos de ouro(III) geralmente possuem geometria quadrado-planar devido a configuração eletrônica d^8 .¹³⁴

O desenvolvimento de novas terapias contra o câncer se tornou um dos principais objetivos da química bioinorgânica. O interesse é a busca por compostos à base de metais que apresentem uma atividade farmacológica diferente dos medicamentos à base de platina.¹³⁴

O potencial citotóxico dos complexos de ouro tem sido muito investigado devido ao fato de serem considerados uma boa alternativa ao uso da cisplatina. Tem sido proposto que o mecanismo de ação desses compostos é independente do DNA e que os complexos de ouro interagem com uma variedade de proteínas alvo dentro da célula.^{135, 136}

O design e teste de complexos de ouro para atividade antitumoral se baseiam em três fundamentos: (1) analogia entre complexos quadrado planos de platina(II) e ouro(III), ambos com configuração d^8 ; (2) analogia dos efeitos imunomodulador dos agentes antiartríticos de ouro(I); (3) complexação do ouro(I) e ouro(III) com agentes antitumorais conhecidos para formar novos compostos com atividade aprimorada.¹³⁷

Existem algumas evidências de que a auranofina possui uma atividade citotóxica limitada em sistemas *in vitro* e na linhagem celular leucêmica P388 *in vivo*; no entanto é inativa em alguns tumores sólidos.¹³⁰ A partir desses resultados, muitos outros compostos de ouro(I) contendo ligantes fosfinas foram sintetizados e apresentaram resultados similares aos da auranofina.¹³⁸ O complexo, $[dppe(AuCl)_2]$ (Figura 1.22 A) foi sintetizado levando em consideração o fato de que o ligante bis(difenil)fosfina, dppe, por si só exibe atividade antitumoral, e que o metal possui a função de proteger o ligante da oxidação e auxiliar na liberação das espécies ativas. O complexo foi avaliado frente as linhagens tumorais de câncer de ovário (M5076) e leucemia (P388).¹³⁹

Em 2010, Che e colaboradores¹⁴⁰ sintetizaram um complexo de ouro(I) com derivado de tiouréia. O complexo apresentou atividade citotóxica *in vitro* significativa frente a linhagem de câncer de pulmão (NCI-H460) com $IC_{50}=3,7 \pm 0,3 \mu M$ (Referência IC_{50} da cisplatina= $38,6 \pm 0,4 \mu M$). A atividade *in vivo* na mesma linhagem foi avaliada e o composto reduziu o tamanho do tumor em 38% após 28 dias. (Figura 1.22 B)

Recentemente um complexo de ouro(I) com ligante NHC (N-heterocyclic carbene), Figura 1.22 C, foi sintetizado e os autores observaram uma atividade citotóxica *in vitro* e *in vivo* frente a linhagem tumoral de câncer de útero (HeLa). O complexo reduziu o tamanho do tumor em 79%. Na tentativa de explicar essa atividade, os autores avaliaram o comportamento do composto na presença de proteínas e

¹³⁴ M. D. Đurovic, Z. D. Bugarcic, R. V. Eldik, Coord. Chem. Rev. 338 (2017) 186-206.

¹³⁵ S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, Med. Res. Rev. 30 (2010) 550-580.

¹³⁶ A. Casini, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P. J. Dyson, B. K. Keppler, L. Messori, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 564-575.

¹³⁷ C. F. Shaw III, Chem. Rev. 99 (1999) 2589-2600.

¹³⁸ M. El Naggar, I. Shehadi, H. E. Abdou, A. A. Mohamed, Inorganics 3 (2015) 139-154.

¹³⁹ S. P. Fricker, Gold Bull. 29 (1996) 53-59.

¹⁴⁰ K. Yan, C. N. Lok, K. Bierla, Chi-Ming Che, Chem. Commun. 46 (2010) 7691-7693.

não observaram nenhuma interação do complexo com a albumina e nem com a Glutationa redutase (GSH).¹⁴¹

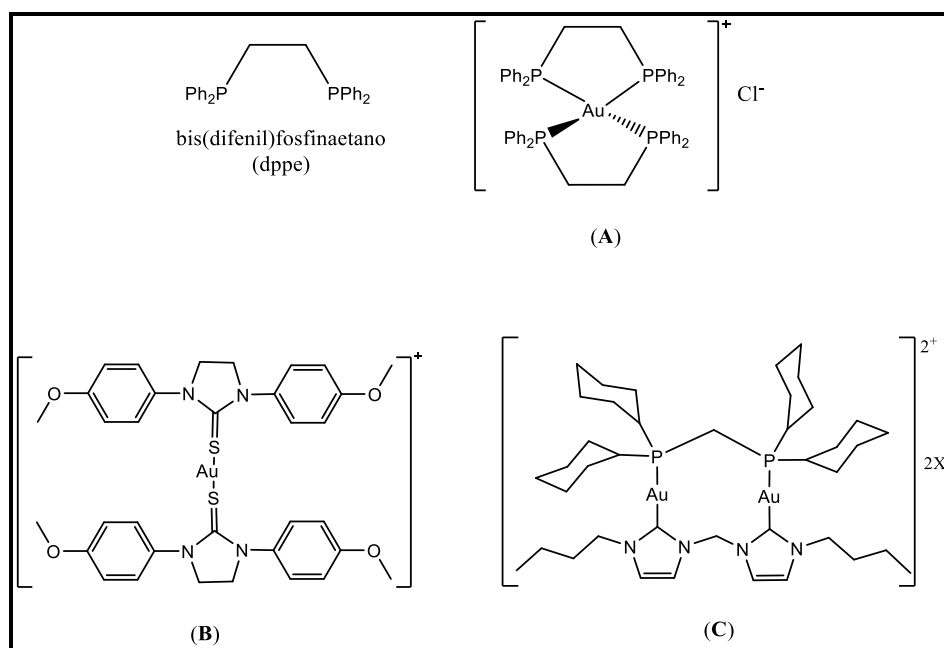


Figura 1.22: Estruturas dos complexos de ouro(I) com atividade antitumoral.^{139,140,141}

Complexos de ouro(III) não têm sido tão investigados quanto os complexos de ouro(I). No entanto, após o sucesso dos complexos de platina(II) como agentes citotóxicos, a busca por novos fármacos com atividade antitumoral aumentou. A similaridade do ouro(III) com a platina(II) despertou o interesse dos pesquisadores para a hipótese de que esses compostos apresentariam atividades similares. Isso se deve ao fato de que os complexos de ouro(III) são isoeletrônicos (d⁸) e isoestruturais (quadrado-plano) aos complexos de platina(II).^{142,143,144,145} Em geral, complexos de ouro(III) não são muito estáveis sob condições fisiológicas devido ao seu alto potencial de redução e sua alta taxa de hidrólise.¹⁴⁶ Portanto, a escolha adequada dos ligantes para aumentar a estabilidade desses compostos é um desafio, já que a estabilidade dos complexos facilita as investigações farmacológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo*.^{147, 148} No entanto, a excessiva estabilização pode causar a perda da atividade.¹⁴⁶

¹⁴¹ T. Zou, C. T. Lum, C. N. Lok, W. P. To, K. H. Low, C. M. Che, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 5810–5814.

¹⁴² P. J. Sadler, *Struct. Bond.* 29 (1976) 171–214.

¹⁴³ A. G. Ortiz, H. Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A. L. Spek, J. J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 1922–1930.

¹⁴⁴ A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1692–1707.

¹⁴⁵ N. Cutillas, G. S. Yellol, C. de Haro, C. Vicente, V. Rodriguez, J. Ruiz, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2784–2797.

¹⁴⁶ L. Messori, F. Abbate, G. Marco, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O’Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3541–3548.

¹⁴⁷ E. R. T. Tiekink, *Inflammopharm.* 16 (2008) 138–142.

¹⁴⁸ A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. A. Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H. H. Fiebig, L. Messori *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 1139–1149.

O complexo $[\text{AuCl}_2(\text{damp})]$ foi o primeiro complexo organometálico de ouro(III), sintetizado em 1984.¹⁴⁹ Esse complexo apresentou atividade citotóxica *in vitro* similar à cisplatina.¹⁵⁰ Quando os dois cloretos foram trocados por íons acetato, $[\text{Au}(\text{OAc})_2(\text{damp})]$, a atividade citotóxica *in vivo* frente ao câncer de bexiga foi observada.¹⁵¹ A estrutura desse complexo está representada na Figura 1.23.

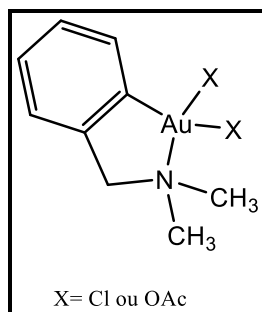


Figura 1.23: Estrutura do complexo de ouro contendo o ligante 2-dimetilamino-metil-fenil (damp).¹³⁹

Conforme discutido previamente, compostos contendo ligantes tiossemicarbazonas apresentam um grande interesse biológico. Dessa forma, em 1998 foi relatado o primeiro complexo de ouro contendo esses ligantes.¹⁵² Outros grupos de pesquisa se dedicam a sínteses de complexos de ouro com tiossemicarbazonas e avaliam as diferentes atividades biológicas.^{153,154,155,156} Nosso grupo tem avaliado a atividade citotóxica desses compostos de ouro frente a diversas linhagens celulares.^{157,158, 159}

¹⁴⁹ J. Vicente, M. T. Chicote, M. D. Bermudez, J. Organomet. Chem. 268 (1984) 191–195.

¹⁵⁰ R. V. Parish, B. P. Howe, J. P. Wright, J. Mack, R. G. Pritchard, R. G. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, Inorg. Chem. 35 (1996) 1659–1666.

¹⁵¹ R. G. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, G. R. Henderson, B. R. C. Theobald, R. V. Parish, B. P. Howe, L. R. Kelland, J. Med. Chem. 39 (1996) 5208–5214.

¹⁵² K. Ortner, U. Abram, Inorg. Chem. Commun. 1 (1998) 251–253.

¹⁵³ U. Abram, K. Ortner, R. Gust, K. Sommer, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (2000) 735–744.

¹⁵⁴ P. N. Fonteh, F. K. Keter, D. Meyer, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1173–1180.

¹⁵⁵ A. R. Rettondin, Z. A. Carneiro, A. C.R. Gonçalves, V. F. Ferreira, C. G. Oliveira, A. N. Lima, R. J. Oliveira, S. Albuquerque, V. M. Deflon, P. I.S. Maia, Eur. J. Med. Chem. 120 (2016) 217–226.

¹⁵⁶ S. D. Khanye, B. Wan, S. G. Franzblau, J. Gut, P. J. Rosenthal, G. S. Smith, K. Chibale, J. Organom. Chem. 696 (2011) 3392–3396.

¹⁵⁷ 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) 587–598.

¹⁵⁸ J. A. Lessa, J. C. Guerra, L. F. de Miranda, C. F.D. Romeiro, J. G. Da Silva, I. C. Mendes, N. L. Speziali, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1729–1739.

¹⁵⁹ 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) 537–544.

Na tentativa de melhorar a atividade antitumoral dos complexos de ouro, diferentes ligantes têm sido utilizados na síntese desses compostos como por exemplo: derivados de bipyridina¹⁶⁰, porfirinas^{161,162}, carbeno N-heterocíclicos¹⁶³, derivados de adamantano¹⁶⁴ e derivados de quinolina.¹⁶⁵

Complexos de ouro apresentam grande potencial como novos agentes antitumorais pois acredita-se que o mecanismo de ação desses compostos envolva como alvo principal as proteínas intracelulares como Tiorredoxina Redutase (TrxR), Topoisomerase, Adenosina difosfato polimerase I (PARP-1) “zinc-finger”, dentre outras.^{166,167,168, 169,170}

Tiorredoxina (Trx), Tiorredoxina Redutase (TrxR) e NADPH compõem o sistema Tiorredoxina que foi descoberto por Peter Reichard e colaboradores em 1964, como um sistema de redução de ribonucleotídeos para desoxiribonucleotídeos em *Escherichia coli*.¹⁷¹ A estrutura PDB da TrxR encontra-se na Figura 1.24.

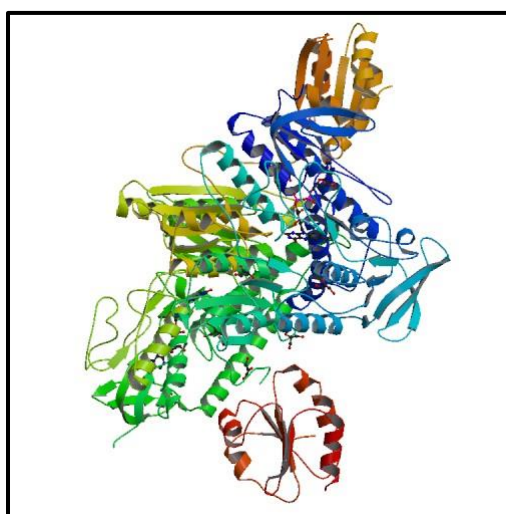


Figura 1.24: Estrutura PDB 3QFB da TrxR.¹⁷²

¹⁶⁰ A. Casini, M.C. Diawara, R. Scopelliti, S.M. Zakeeruddin, M. G. Catzel, P.J. Dyson, Dalton Trans. 39 (2010) 2239-2245.

¹⁶¹ C. M. Che, R. W. Y. Sun, W. Y. Yu, C. B. Ko, N. Zhu, H. Sun, Chem. Commun. 2003, 1718–1719.

¹⁶² C. T. Lum, R. W. Y. Sun, T. Zou, C. M. Che, Chem. Sci. 5 (2014) 1579–1584.

¹⁶³ T. Zou, C. T. Lum, S. S. Y. Chui, C. M. Che, Angew. Chem. Int. Ed. 52 (2013) 2930 –2933.

¹⁶⁴ A. Garcia, R. C. Machado, R. M. Grazul, M. T. P. Lopes, C. C. Corrêa, H. F. Dos Santos, M. V. de Almeida, H. Silva, J. Biol. Inorg. Chem. 21 (2016) 275–292.

¹⁶⁵ C. M. Santos, E. Michelucci, T. Marzo, L. Messori, P. Szumlas, P. J. Bednarski, R. Mas-Balleste, C. Navarro-Ranninger, S. Cabrera, J. Aleman, J. Inorg. Biochem. 153 (2015) 339–345.

¹⁶⁶ M.P. Rigobello, A. Folda, B. Dani, R. Menabò, G. Scutari, A. Bindoli, Eur. J. Pharm. 582 (2008) 26–34.

¹⁶⁷ E. Vergara, A. Casini, F. Sorrentino, O. Zava, E. Cerrada, M. P. Rigobello, A. Bindoli, M. Laguna, P. J. Dyson, Chem. Med. Chem. 5 (2010) 96–102.

¹⁶⁸ F. Mendes, M. Groessl, A. A. Nazarov, Y. O. Tsybin, G. Sava, I. Santos, P. J. Dyson, A. Casini, J. Med. Chem. 54 (2011) 2196–2206.

¹⁶⁹ A. Jacques, C. Lebrun, A. Casini, I. Kieffer, O. Proux, J-M. Latour, O. Seneque, Inorg. Chem. 54 (2015) 4104–4113.

¹⁷⁰ M. Serratrice, F. Edfafe, F. Mendes, R. Scopelliti, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel, I. Santos, M. A. Cinellua, A. Casini, Dalton Trans. 41 (2012) 3287-3293.

¹⁷¹ T. C. Laurent, E. C. Moore, P. Reichard, B. J. Biol. Chem. 239 (1964) 3436–3444.

¹⁷² Protein Data Bank, PDB ID: 3QFD, <https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3QFB>, acessado em 10 de outubro de 2017.

A TrxR é uma selenoenzima responsável pela redução do dissulfeto do substrato tiorredoxina (Trx) a ditiol pelo NADPH. O ditiol, por sua vez, é um importante redutor celular, o qual está envolvido em reações como: síntese enzimática de desoxiribonucleotídeos e defesa contra estresse oxidativo.¹⁷³

A Figura 1.25 mostra o ciclo de reações redox de que a TrxR participa.¹⁴⁴ Essa enzima está envolvida em numerosos caminhos metabólicos e condições fisiopatológicas (tumores, doenças infecciosas, artrite reumatóide).¹⁷⁴ Uma elevada expressão da tiorredoxina está associada com o aumento da proliferação das células tumorais, inibição da apoptose, crescimento do tumor e diminuição da vida dos pacientes.¹⁷⁵ Devido a esses fatores, a enzima TrxR se tornou um potencial alvo para a quimioterapia do câncer.¹⁷⁶

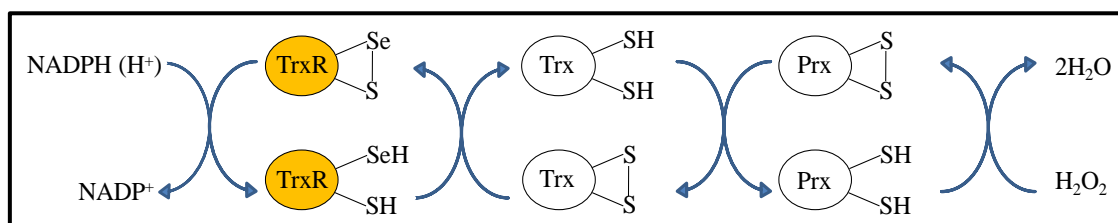


Figura 1.25: Ciclo de reações redox da TrxR.

A auranofina, um complexo de ouro(I), já é relatada na literatura como um potente inibidor da enzima TrxR^{174,177} e outras selenoenzimas.^{178,179} A literatura reporta complexos de ouro que apresentam atividade inibitória sobre TrxR, demonstrando a relevância desta enzima na farmacologia de compostos que contêm este metal. Estudos sugerem a ligação do íon metálico ao selênio presente no sítio ativo da TrxR como um dos possíveis mecanismos de inibição da enzima.¹⁴⁴

A Topoisomerase é outro alvo enzimático importante para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais efetivos. Essa família de enzimas é capaz de controlar o estado topológico do DNA durante vários processos celulares como a replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica.¹⁸⁰ São divididas em duas subfamílias: tipo I e tipo II. A enzima tipo I cliva de forma transitória uma fita do DNA, enquanto a enzima tipo II cliva as duas fitas da molécula de DNA e sua atividade está relacionada à presença do ATP. Além disso, cada subfamília possui duas diferentes classes: tipo A, na

¹⁷³ L. Zhong, E. S. J. Arnér, A. Holmgren, *Biochem.* 97 (2000) 5854–5859.

¹⁷⁴ S. Gromer, S. Urig, K. Becker, *Med. Res. Rev.* 24 (2004) 40–89.

¹⁷⁵ P. Nguyen, R. T. Awwad, D. D. K. Smart, D. R. Spitz, D. Guis, *Cancer Lett.* 236 (2005) 164–174.

¹⁷⁶ K. Becker, S. Gromer, R. H. Schirmer, S. Muller, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6118–6125.

¹⁷⁷ C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M. P. Rigobello, *Free Radical Biol. Med.* 42 (2007) 872–881

¹⁷⁸ M. J. Berry, J. D. Kieffer, J. W. Harney, P. R. Larsen, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 14155–14158.

¹⁷⁹ J. Chaudiere, Al L. Tappel, *J. Inorg. Biochem.* 20 (1984) 313–325.

¹⁸⁰ P. Thapa, K. Y. Jun, T. M. Kadayat, C. Park, Z. Zheng, T. B. T. Magar, G. Bist, A. Shrestha, Y. Na, Y. Kwon, E. S. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 6454–6466.

qual a enzima forma uma ligação covalente com a extremidade 5' do DNA gerada após a clivagem, enquanto a enzima tipo B forma uma ligação covalente com a extremidade 3' da molécula.^{181,182}

A topoisomerase IB (Topo IB) é de grande interesse clínico e a síntese de inibidores dessa enzima tem sido relatada na literatura.^{183,184} Complexos quadrado-planos com configuração d^8 exibem promissora atividade antitumoral^{185,186} por ligação covalente do íon metálico com o DNA, por intercalação dos complexos planares entre os pares das bases do DNA, ou por inibição da atividade da topoisomerase.^{187,188} A estrutura PDB do complexo DNA-Topoisomerase IB encontra-se na Figura 1.26.

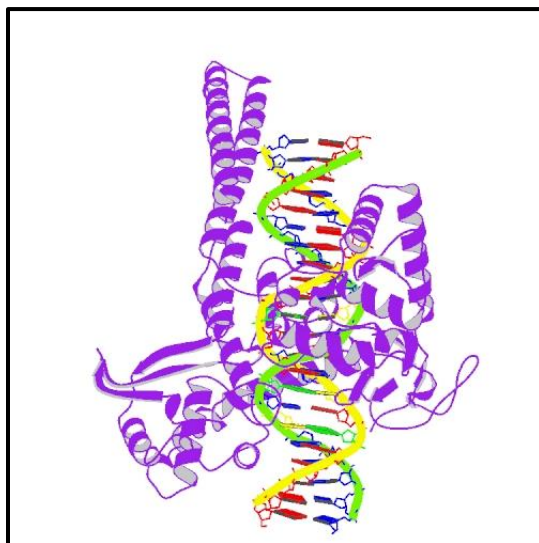


Figura 1.26: Estrutura PDB 1A36 do complexo DNA-Topoisomerase IB.¹⁸⁹

Além da atividade antitumoral, têm sido relatadas na literatura outras atividades biológicas apresentadas pelos complexos de ouro como as atividades: anti-HIV^{154,190}, anti-tripanicida¹⁵⁵, anti-inflamatória¹⁹¹, antituberculose e antimalárica.¹⁵⁶

¹⁸¹ S. Castelli, P. Katkar, O. Vassallo, M. Falconi, S. Linder, A. Desideri, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 13 (2013) 356–363.

¹⁸² S. Vieira, S. Castelli, M. Falconia, J. Takarada, G. Fiorillo, F. Buzzetti, P. Lombardi, A. Desideri, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 68–75.

¹⁸³ S. Castelli, O. Vassallo, P. Katkar, C. M. Che, R. W. Y. Sun, A. Desideri, *Arch. Biochem. Biophys.* 516 (2011) 108–112.

¹⁸⁴ S. Vieira, S. Castelli, A. Desideri, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 76–82.

¹⁸⁵ K. S. Lovejoy, S. J. Lippard, *Dalton Trans.* (2009) 10651–10659.

¹⁸⁶ R. W. Sun, D. L. Ma, E. L. Wong, C. M. Che, *Dalton Trans.* (2007) 4884–4892

¹⁸⁷ C. M. Che, F. M. Siu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 255–261

¹⁸⁸ Y. C. Lo, T. P. Ko, W. C. Su, T. L. Su, A. H. J. Wang, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1082–1092.

¹⁸⁹ Protein Data Bank, PDB ID: 1A36, <https://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1a36>, acessado em 10 de outubro de 2017.

¹⁹⁰ O. Sánchez, S. González, A. R. Higuera-Padilla, Y. Leon, D. Coll, M. Fernandez, P. Taylor, I. Urdanibia, H. R. Rangel, J. T. Ortega, W. Castro, M. C. Goite, *Polyhedron* 110 (2016) 14-23.

¹⁹¹ J. Vanco, J. Galikova, J. Hosek, Z. Dvorak, L. Parakova, Z. Travnicek, *PloS One* 9 (2014) 1-15.

1.10 O presente trabalho: Objetivos

No presente trabalho foram obtidos complexos metálicos de duas classes de ligantes: (a) tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, que haviam mostrado atividade citotóxica em estudos anteriores, e para as quais investigamos o efeito da coordenação aos metais sobre a atividade e sobre o mecanismo de ação; (b) hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda, nos quais a porção base de Schiff consiste de um sistema quelante, permitindo a coordenação a íons metálicos e de interesse.

Os compostos foram avaliados quanto à atividade citotóxica frente a linhagens celulares leucêmicas e de tumores sólidos. Foram ainda realizados estudos de inibição das enzimas Tiorredoxina Redutase (TrxR) e Topoisomerase IB e interação com o DNA, potenciais alvos biológicos dos complexos estudados.

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

- (a) A utilização da coordenação dos íons metálicos ouro(III), paládio(II) e platina(II) com 3-(4-bromofenil)-1-piridina-2-ilprop-2-en-1-ona tiossemicarbazona (HPyCT4BrPh, **HL1**), cuja atividade citotóxica já havia sido demonstrada pelo nosso grupo, para a investigação como possíveis candidatos a metalofármacos antitumorais.
- (b) Estudos da atividade citotóxica dos complexos obtidos com **HL1**, frente às linhagens de células tumorais Jurkat, THP-1 (células leucêmicas), MDA-MB 231, MCF-7, HCT-116 (células de tumores sólidos) e Vero (células não tumorais).
- (c) Estudos de interação com o DNA por meio de eletroforese e estudos da inibição das enzimas Tiorredoxina Redutase e Topoisomerase IB pelos compostos de ouro(III) com **HL1**.
- (d) A coordenação de ouro(III) com as tiossemicarbazonas contendo o substituinte N-mostarda: 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-feniltiossemicarbazona (**HL5**), N(4)-para-clorofenil-tiossemicarbazona (**HL6**) e N(4)-metil-tiossemicarbazona (**HL7**).
- (e) Estudo da atividade citotóxica dos complexos de ouro(III) com **HL5**, **HL6**, **HL7** utilizando as linhagens celulares B16F10 (melanoma), NCI-H460 (câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de mama) e HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana, usada como modelo de células não tumorais).
- (f) Estudos da atividade citotóxica das tiossemicarbazonas **HL5**, **HL6**, **HL7** e da hidrazona **HL2** utilizando as linhagens celulares de melanomas B16F10, A375 e A2058 e HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana, usada como modelo de células não tumorais).
- (g) Estudos de mecanismo de ação de **HL5** e **HL2**.
- (h) Estudos de interação com o DNA por meio de eletroforese dos complexos de ouro(III) com as tiossemicarbazonas contendo o substituinte N-mostarda.
- (i) Investigações teóricas sobre a capacidade de alquilação dos compostos base de Schiff contendo o substituinte nitrogênio mostarda.

Capítulo 2. Parte Experimental

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 solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Merck, Synth e Vetec). Os solventes deuterados foram de procedência CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

2.1.2. Determinação de temperaturas de fusão

As temperaturas de fusão (ou decomposição) foram determinadas em um equipamento Mettler-FP90, dotado de célula de aquecimento Metler-FP82HT e Microscópio Olympus CH-2 com controlador digital de temperatura.

2.1.3. Pesagens

As pesagens foram feitas em uma balança analítica Gehaka, modelo AG 200, com sensibilidade de 0,0001 g, ou em uma balança Cubis de Sartoris, modelo MSU com sensibilidade de 0,00001g.

2.1.4 Análise elementar

As análises elementares foram realizadas no Departamento de Química da UFMG ou via solicitação de serviço externo à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Os equipamentos utilizados são de mesmo modelo, CHN 2400, Perkin Elmer.

2.1.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, alocado no Departamento de Química da UFMG. Os espectros foram obtidos na região entre 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , a partir de pastilhas de KBr contendo o composto.

2.1.6 Análises condutimétricas

O equipamento utilizado nas medidas de condutividade molar foi um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica de mesmo fabricante de constante 0,088 cm^{-1} . As medidas foram feitas a partir de uma solução do composto ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) no solvente selecionado, N,N-dimetilformamida (DMF). Os resultados foram analisados conforme os dados apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (DMF).
 $\Lambda_M (\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1})$

Tipo eletrólito	$\Lambda_M (\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1})$	
	J. W. Geary ¹	R. G. Velho ²
Não-eletrólito	< 65	< 37
1:1	65-90	31-122
2:1	130-170	90-194
3:1	200-240	201-284

2.1.7 Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados nos espectrômetros Bruker DRX-400 AVANCE (400 MHz) e Bruker AVANCE DPX-200 (200 MHz) localizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Departamento de Química da UFMG. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO-*d*₆, DMF-*d*₇ ou MeOD-*d*₄ como solvente e TMS como referência interna.

2.1.8 Análises Térmicas

As curvas termogravimétricas foram obtidas em termo balança Shimadzu-TGA 50H do Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de N₂, com razão de aquecimento de 5 °C min⁻¹ e 10 °C min⁻¹. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 750 °C.

2.1.9 Cristalografia por Difração de Raios-X

As estruturas cristalográficas foram determinadas por meio de medidas realizadas no LabCri (Laboratório de Cristalografia da UFMG) utilizando-se um difratômetro Oxford GEMINI. Essas medidas foram realizadas pelo Prof. Dr. Nivaldo Spezziali do Departamento de Física da UFMG. Os detalhes e condições experimentais de cada medida são descritos nos capítulos correspondentes.

2.2 Sínteses dos ligantes e complexos

Os compostos deste trabalho foram obtidos segundo procedimentos descritos a seguir. Estes foram caracterizados através de microanálises, medidas da condutividade molar, termogravimetria, medidas de ponto de fusão, espectros de infravermelho, de RMN de ¹H, ¹³C, e subespectros de DEPT135, COSY, HSQC, HMBC e NOESY. Cristais tiveram sua estrutura determinada pela técnica de difração de raios-X de monocristal.

¹W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81-122.

²R.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.

2.2.1 Sínteses da tiossemicarbazona derivada da chalcona e seus complexos de ouro(III), platina(II) e paládio(II)

2.2.1.1 Preparação da chalcona: 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4BrPh)

A chalcona foi obtida usando um procedimento análogo ao descrito na literatura.^{3,4} Uma solução de NaOH 10% (m/v) (7,5-12,5 mL) foi adicionada gota a gota a uma mistura de 2-acetilpiridina (10 mmol) e do 4-bromobenzaldeído (10 mmol) em metanol (15 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por 1 h à temperatura ambiente. O sólido obtido foi filtrado, lavado com água e secado sob pressão reduzida. O rendimento do produto foi 80%. (Figura 2.1)

2.2.1.2 Síntese de 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-onatiossemicarbazona, (HPyCT4BrPh) (HL1)

A tiossemicarbazona derivada da chalcona foi obtida de acordo com o procedimento descrito na literatura.⁵ Cinco gotas de HCl concentrado foram adicionadas a uma mistura da chalcona PyC4BrPh (4 mmol) e tiossemicarbazida (4 mmol) em metanol (20 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 2 h à temperatura ambiente. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água e éter etílico, e secado sob pressão reduzida. O rendimento foi 75%.

O esquema de reação para obtenção da chalcona e da tiossemicarbazona HPyCT4BrPh (HL1) está representado na Figura 2.1.

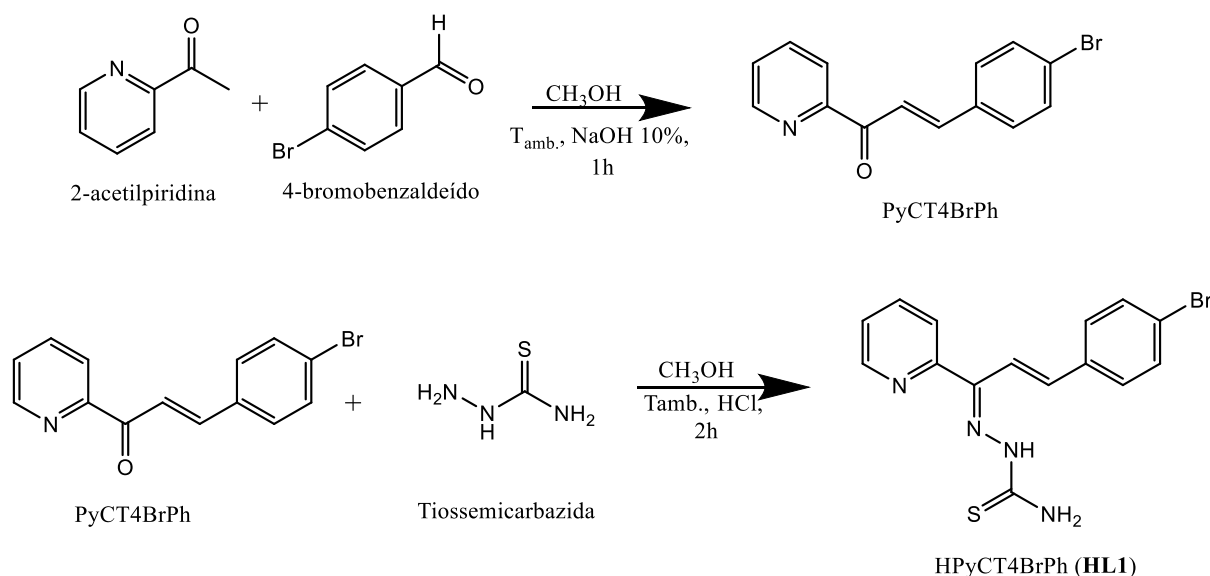


Figura 2.1: Esquema de reação para obtenção da chalcona e da tiossemicarbazona (HL1).

³Fan, X. Wang, P. Ding, J. Wang, Z. Liang, X. Tao., Dyes and Pigments 95 (2012) 757-767.

⁴V.V. Zakharychev, A.V. Kuzenkov. Chem. Heterocycl. Comp. 43 (2007) 989-995.

⁵J. G. Da Silva, C. H. Perdigão, N. L. Speziali, H. Beraldo, J. Coord. Chem. 66 (2013) 385-401.

2.2.1.3 Síntese do complexo cloreto de [cloro(3-(4-bromo-fenil)-1-piridin-2-ilprop-2-en-1-en-thiossemicarbazonato)ouro(III)], [Au(L1)Cl]Cl (1)

O complexo de ouro foi obtido usando um procedimento análogo ao descrito na literatura.⁶ Em uma solução de metanol/acetona (1:1), adicionou-se 1 mmol da tiossemicarbazona e tetracloroaurato(III) de hidrogênio trihidratado (HAuCl₄·3H₂O), na proporção 1:1 ligante-metal. A reação permaneceu sob proteção da luz e agitação a temperatura ambiente por 24 h. O sólido resultante foi filtrado e lavado com metanol e acetona, e secado sob pressão reduzida. O rendimento do produto foi de 72%.

2.2.1.4 Síntese do complexo [cloro(3-(4-bromo-fenil)-1-piridin-2-ilprop-2-en-1-en-thiossemicarbazonato)platina(II)]hemi cloreto de potássio, [Pt(L1)Cl]0,5KCl (2)

O complexo de platina foi obtido utilizando procedimento descrito na literatura.⁷ Em uma solução de metanol adicionou-se 1 mmol da tiossemicarbazona e uma solução aquosa do sal de platina (K₂PtCl₄) em quantidade equimolar. A reação permaneceu em refluxo por 2 h. O sólido resultante foi filtrado e lavado com metanol e éter, e secado sob pressão reduzida. O rendimento foi 81%.

2.2.1.5 Síntese do complexo [cloro(3-(4-bromo-fenil)-1-piridin-2-ilprop-2-en-1-en-thiossemicarbazonato)paládio(II)]cloreto de potássio, [Pd(L1)Cl]KCl (3)

O complexo de paládio foi obtido utilizando procedimento descrito na literatura.⁸ Em uma solução de metanol adicionou-se 1 mmol da tiossemicarbazona e uma solução aquosa do sal de paládio (K₂PdCl₄) em quantidade equimolar. A reação permaneceu em refluxo por 2 h. O sólido resultante foi filtrado e lavado com metanol e éter, e secado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 72%.

Na Figura 2.2 estão representadas as rotas sintéticas para a obtenção dos complexos de ouro(III), paládio(II) e platina(II) com a tiossemicarbazona (**HL1**).

⁶J.A. Lessa, J. C. Guerra, L.F. De Miranda, C.F.D. Romeiro, J.G. Da Silva, I.C. Mendes, N.L. Speziali, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1729-1739.

⁷K.O.S. Ferraz, L. Fernandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.F. Leite, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, Polyhedron 30 (2011) 315-321.

⁸K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C.M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7138-7144.

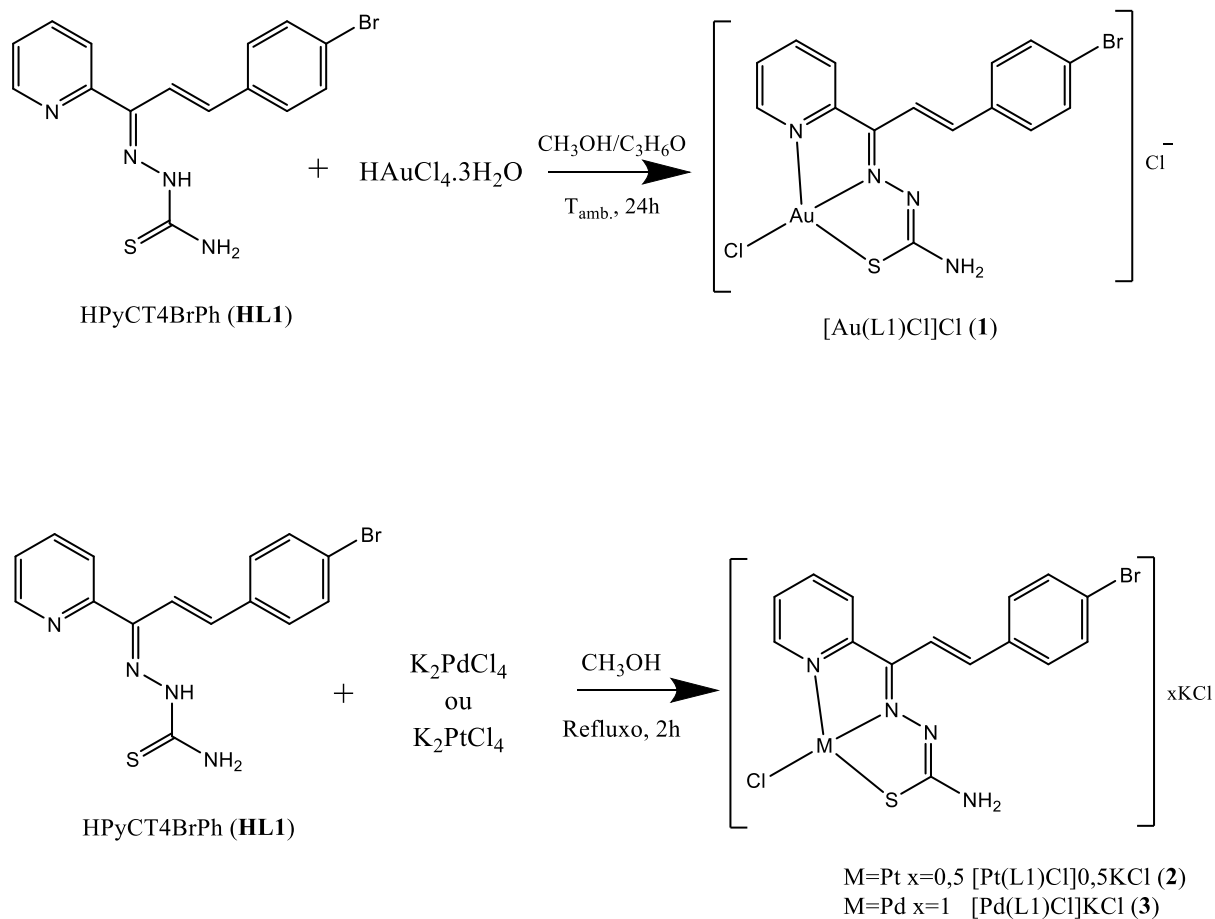


Figura 2.2: Esquema das rotas sintéticas para obtenção dos complexos (1), (2) e (3).

Para fins de comparação, foi utilizado também o complexo de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]$ (4), previamente sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa⁹, representado na Figura 2.3.

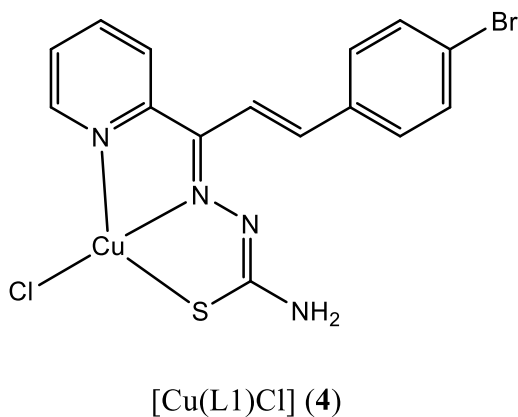


Figura 2.3: Estrutura do complexo (4).

⁹ J. G. Da Silva, A. A. R. Despaigne, S. R. W. Louro, C. C. Bandeira, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 65 (2013) 415-426.

2.2.2 Sínteses das hidrazonas contendo o grupo farmacofórico N-mostarda

2.2.2.1 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído fenilhidrazona, (**HL2**); 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-*p*-cloro-fenilhidrazona, (**HL3**); 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-metil-hidrazona (**HL4**).

As hidrazonas foram preparadas conforme procedimento descrito na literatura.^{11,12} A uma solução metanólica do aldeído, 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído (2 mmol), foram adicionadas quatro gotas de ácido acético glacial e posteriormente a hidrazida de interesse (2 mmol). A mistura reacional foi mantida em refluxo por 6 h e o sólido resultante foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico, e secado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 75% (**HL2**), 90% (**HL3**) e 75% (**HL4**). Na Figura 2.4 está representada a rota sintética para esses ligantes.

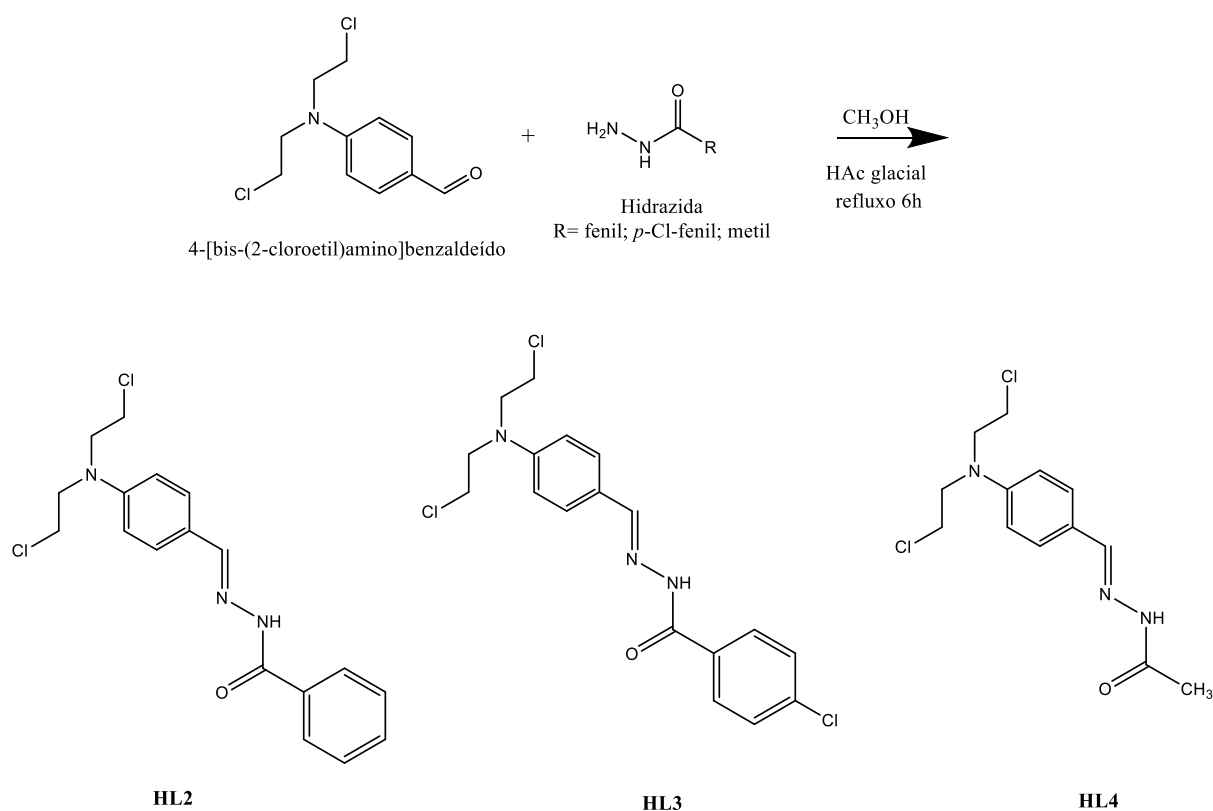


Figura 2.4: Esquema de reação para obtenção das hidrazonas **HL2-HL4**.

2.2.3 Sínteses das tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico N-mostarda e seus complexos de ouro(III)

As tiossemicarbazonas^{10,11,12,13,14,15} e os complexos (inéditos) de ouro(III), foram preparados conforme procedimentos descritos na literatura⁶. O procedimento geral de obtenção dos ligantes está descrito abaixo:

Duas gotas de HCl concentrado foram adicionadas a uma mistura do aldeído (4 mmol) e a tiossemicarbazida de interesse (4 mmol) em metanol (15 mL). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 4 h. O sólido amarelo resultante foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico, e secado sob pressão reduzida.

2.2.3.1 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-feniltiossemicarbazona, (HL5)

O ligante foi obtido pela condensação equimolar de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído com 4-fenil-tiossemicarbazida, em meio alcoólico e quantidade catalítica de ácido clorídrico. O produto obtido apresentou rendimento de 97%.

2.2.3.2 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-para-clorofeniltiossemicarbazona, (HL6)

A tiossemicarbazona foi obtida a partir da reação direta, pela condensação equimolar de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído com 4-para-cloro-feniltiossemicarbazida, em meio alcoólico e quantidade catalítica de ácido clorídrico. O produto obtido apresentou rendimento de 70%.

¹⁰R.P. Tenório, A.J.S. Góes, J.G. De Lima, A. R. De Faria, A.J. Alves, T.M. De Aquino, Química Nova 28 (2005) 1030-1037.

¹¹A. Perez-Rebolledo, L.R. Teixeira, A.A. Batista, A.S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M.González, Paola Hernández, A.M. Ferreira, N.L. Speziali, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 939-948.

¹²C. Rodrigues, A.A. Batista, R.Q. Aucélio, L.R. Teixeira, L. do Canto Visentin, H. Beraldo, Polyhedron 27 (2008) 3061-3066.

¹³R.P. Tenório, A.J.S. Góes, J.G. De Lima, A. R. De Faria, A.J. Alves, T.M. De Aquino, Química Nova 28 (2005) 1030-1037.

¹⁴A. Perez-Rebolledo, L.R. Teixeira, A.A. Batista, A.S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M.González, Paola Hernández, A.M. Ferreira, N.L. Speziali, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 939-948.

¹⁵C. Rodrigues, A.A. Batista, R.Q. Aucélio, L.R. Teixeira, L. do Canto Visentin, H. Beraldo, Polyhedron 27 (2008) 3061-3066.

2.2.3.3 Síntese de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-*N*-metiltiossemicarbazona, (HMosSMe), (HL7)

A tiossemicarbazona foi obtida pela condensação equimolar de 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído com 4-metil-3-tiossemicarbazida, em meio alcoólico e quantidade catalítica de ácido clorídrico. O produto obtido apresentou rendimento de 70%.

A rota sintética para a obtenção dos ligantes HL5, HL6 e HL7 está representada na Figura 2.5.

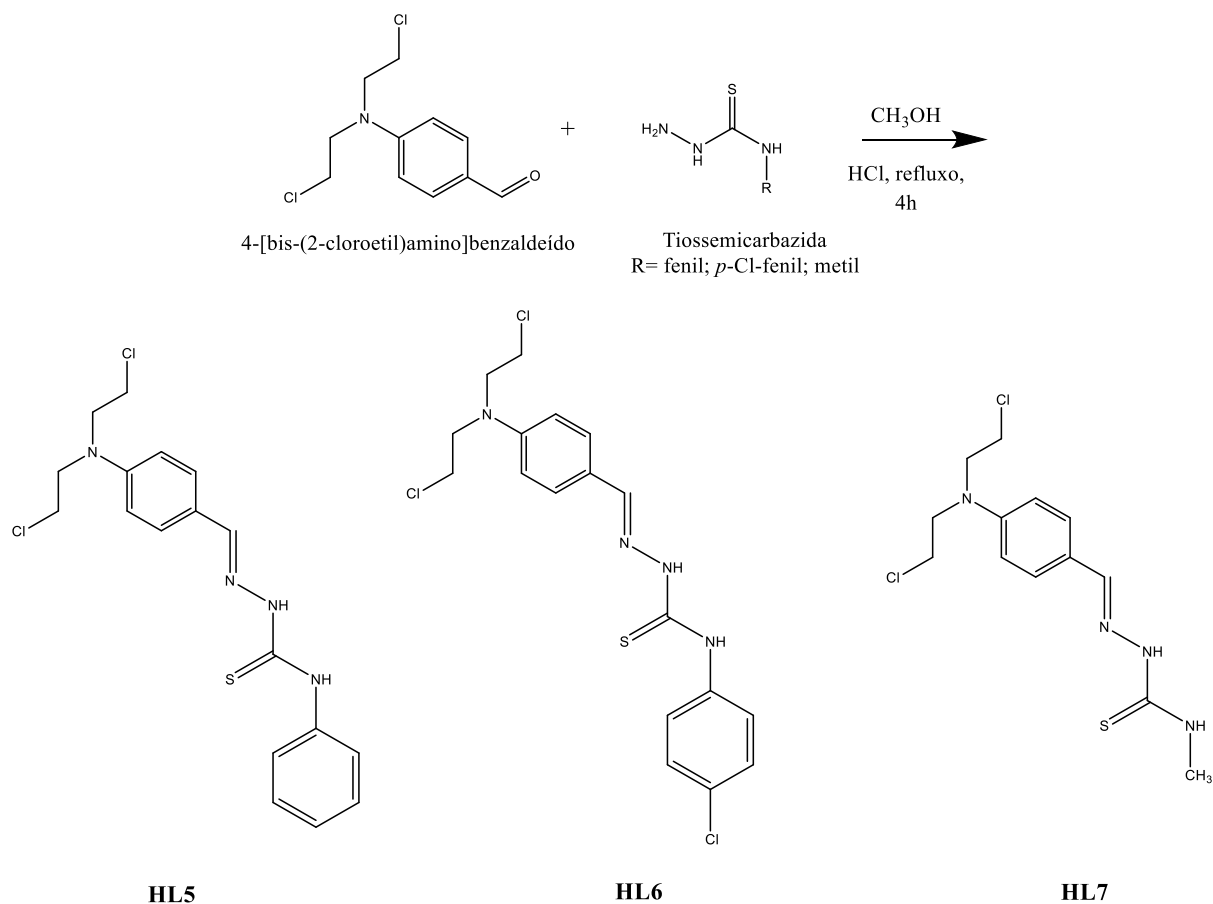


Figura 2.5: Esquema de reação para obtenção das tiossemicarbazonas HL5-HL7.

2.2.3.4 Síntese dos complexos de ouro(III) de bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído *N*(4)-feniltiossemicarbazona [Au(L5)Cl₂] (5), *N*(4)-*p*-cloro-feniltiossemicarbazona [Au(L6)Cl₂] (6), e *N*-metiltiossemicarbazona [Au(L7)Cl₂] (7)

Em uma solução (10 mL) de metanol/acetona (1:1), adicionou-se 1 mmol da tiossemicarbazona de interesse e tetracloouroato(III) de hidrogênio trihidratado (HAuCl₄·3H₂O), na proporção 1:1 ligante-metal. A reação permaneceu sob proteção da luz e agitação a temperatura ambiente por 24 h. O sólido resultante foi filtrado e lavado com metanol e acetona, e secado sob pressão

reduzida. Os rendimentos dos produtos obtidos foram de 50% $[\text{Au}(\text{L5})\text{Cl}_2]2\text{HCl}$ (**5**), 68% $[\text{Au}(\text{L6})\text{Cl}_2]2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**), e 50% $[\text{Au}(\text{L7})\text{Cl}_2]2\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**7**). Na Figura 2.6 está representada a rota sintética para a obtenção dos complexos (**5**), (**6**) e (**7**).

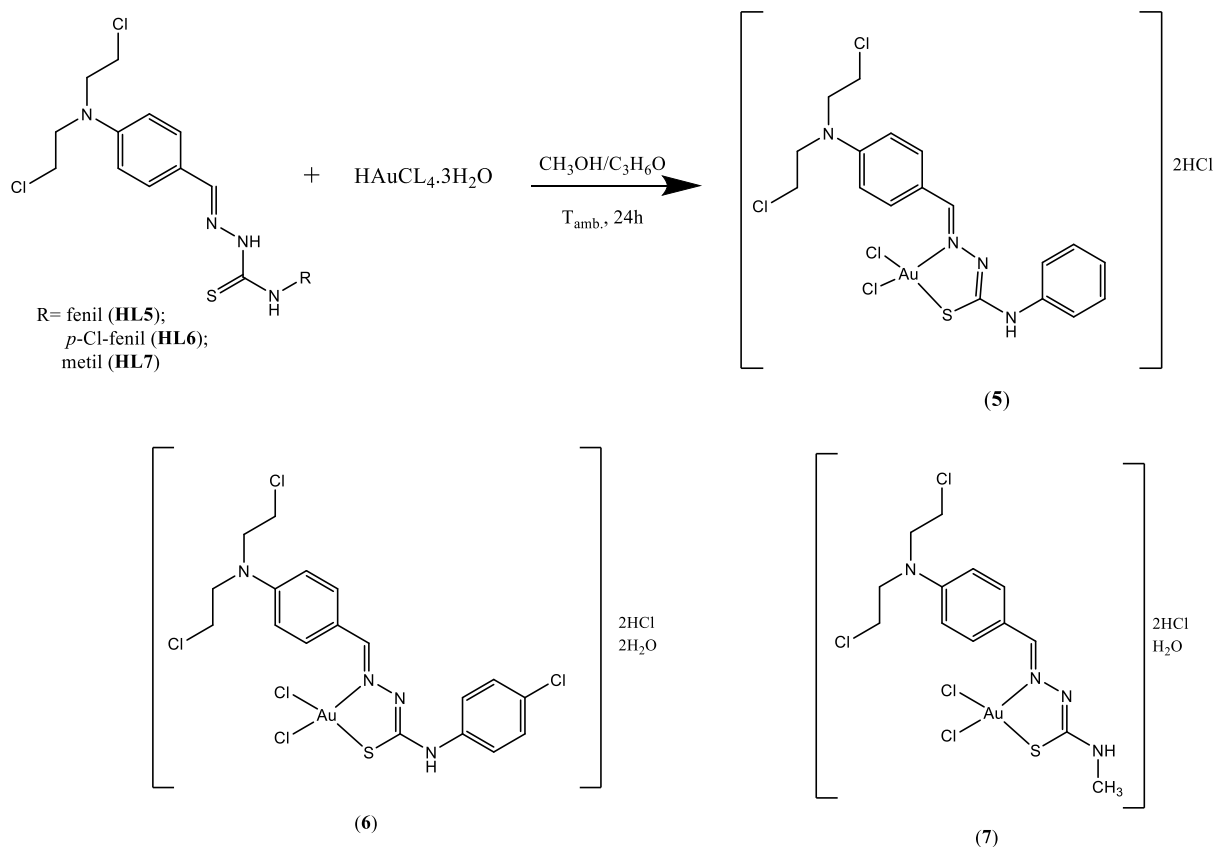


Figura 2.6: Esquema da rota sintética para obtenção dos complexos (**5**), (**6**) e (**7**).

2.3. Ensaios biológicos

2.3.1 Avaliação da atividade citotóxica de 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-onatiossemicarbazona, (**HL1**) e seus complexos metálicos

A avaliação preliminar das atividades citotóxicas dos compostos em células tumorais foi realizada no Departamento de Fisiologia da UFMG, em colaboração com a Prof^a. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes. Foram utilizadas as linhagens celulares: HL60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia linfóide), THP-1 (leucemia monocítica), MCF-7 e MDA-MB-231 (carcinoma mamário), HCT-116 (carcinoma colo-retal) e Vero (rim de macaco verde, usada como modelo de células não tumorais).

Inicialmente foi preparada uma solução estoque dos compostos em DMSO na concentração de 20 mmol L⁻¹. Para os ensaios com células, foi preparada uma solução trabalho a 100 μmol.L⁻¹. A concentração final dos compostos nos ensaios de triagem foi de 1 μmol.L⁻¹ e a concentração final de DMSO foi menor que 0,5%.

No teste de avaliação da atividade citotóxica, as suspensões de células foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ para estabilização. Após a estabilização, todas as células foram incubadas com os compostos (1 µmol.L⁻¹) por 48 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade. Paralelamente, foram utilizados a cisplatina e o etoposídeo como controle positivo e DMSO (concentração menor do que 5%) como controle negativo. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata para cada linhagem celular testada.

A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) a formazan. O MTT é um corante amarelo que, na presença de células vivas, é reduzido formando o formazan, um produto de coloração roxa, insolúvel em água.¹⁶ Faltando 4 h para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados 20 µL de uma solução de MTT (2,5 mg mL⁻¹). Após 4 h, o sobrenadante foi retirado a vácuo e a cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl (0,04 mol.L⁻¹) em isopropanol para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram lidas em leitor ELISA a um comprimento de onda de 595 nm. Os valores de porcentagem de inibição de proliferação celular dos compostos em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,5%) foram obtidos através da Equação 2.1.

$$\% \text{ Inibição da proliferação} = 100 - [(Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{DMSO (0.5\%)}] \quad \text{(Equação 2.1)}$$

Os compostos que inibiram mais que 50% da proliferação celular foram submetidos à determinação da concentração necessária para matar 50% das células (CI₅₀). Os valores de CI₅₀ foram determinados em diferentes concentrações na faixa de 0,001 a 100,0 µmol.L⁻¹. Todos os compostos foram testados em triplicatas, em três experimentos independentes.

2.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos da série tiossemicarbazona/hidrazona contendo o grupo farmacofórico N-mostarda

Estudos com o intuito de avaliar a atividade citotóxica dos ligantes (**HL2**, **HL5**, **HL6** e **HL7**) 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 tumorais NCI-H460 (carcinoma pulmonar humano), B16F10 (melanoma murino), A2058 e A375 (melanoma humano), MCF-7 (câncer de mama) e frente às células não malignas HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana).

A avaliação de apoptose foi realizada 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.

¹⁶J. A. Plumb, R. Miloroy, S.B. Kaye, Cancer Res. 49 (1989) 4435-4440.

2.3.2.1 Linhagens celulares e condições de cultura

As células foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA). As linhagens foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) e 1% de penicilina-estreptomicina a 37 °C sob uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂.

2.3.2.2 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 formazan para determinar o valor da concentração que inibe 50 % da viabilidade celular (CI₅₀) de cada composto. 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. As células 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 (5 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 foi calculada usando a Equação 2.2, na qual DOT representa os valores de DO do grupo de tratamento e DOC representa os valores de DO do grupo controle.

$$\text{Viabilidade celular / \%} = (\text{DOT} / \text{DOC}) \times 100 \text{ (Equação 2.2)}$$

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

A ocorrência de apoptose/necrose foi determinada utilizando o kit *FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis* (Invitrogen Inc., UK.). 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 marcadas com iodeto de propídeo (IP), o que permite a discriminação entre as células apoptóticas e necróticas.

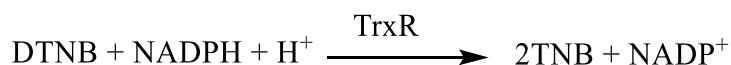
As células B16F10 foram cultivadas em placas de 12 poços (5 x 10⁵ células por poço) e incubadas. Após a incubação, as células foram tratadas por 12 h com 10 e 20 µM do ligante **HL5**, ou 50 µM de cisplatina (controle positivo à apoptose). Em seguida, as células foram ressuspensas com tampão de ligação para anexina V e coradas com 5 µL de anexina V-FITC e 1 µL da solução de iodeto de propídeo (100 µg mL⁻¹) em tampão por 30 min, a 4 °C e na ausência de luz.

2.3.2.4 Análises Western blot

Como forma de avaliar o mecanismo de ação de **HL5**, os níveis de expressão das proteínas das vias de sinalização apoptóticas foram investigados. As células B16F10 foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas. Após a incubação as células foram tratadas por 24 h com 10 e 20 μM do ligante **HL5**, ou 50 μM de cisplatina (controle positivo à apoptose). Após o tratamento, as células foram lisadas com tampão de lise suplementado com inibidores de protease e fosfatases (Cell Signaling Technology Inc). A concentração de proteína foi medida usando o Ensaio de Proteína Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Depois que as proteínas SDS-PAGE foram transferidas para membranas de polivinilidendifluoreto (PVDF, 0,45 μM) (Millipore Immobilon). As membranas foram bloqueadas e incubadas com anticorpos primários (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA). Após a incubação, a membrana foi lavada em PBS-T e uma vez com PBS seguiu a imagem usando os Sistemas de Imagem ChemiDoc. (Biorad).

2.3.3 Estudos de inibição da enzima Tiorredoxina Redutase (TrxR)

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



O procedimento foi realizado de acordo com instruções da Sigma (Informação do produto T9698) e com Ott e colaboradores.¹⁷ Aliquotas de 20 μL de uma solução diluída de TrxR em tampão fosfato de potássio (1,0 mol.L^{-1} , pH 7,0), contendo aproximadamente 0,10 unidades da enzima, foram incubadas por 1 h a 37 °C com 20 μL de soluções dos complexos, em dez diferentes concentrações, na faixa de 0,05 a 50,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou com DMF 2,5% (controle negativo). As soluções foram transferidas quantitativamente para placas de 96 poços e a cada poço foram adicionados 200 μL de mistura reacional (10 mL de mistura reacional consiste de: 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 1,0 mol.L^{-1} pH 7,0; 0,2 mL de EDTA 500 mmol.L^{-1} pH 7,5; 0,80 mL de DTNB 63 mmol.L^{-1} em etanol; 0,10 mL de albumina de soro bovino 20 mg mL^{-1} ; 0,05 mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) 48 mmol.L^{-1} e 7,85 mL de água).

Imediatamente após a adição da mistura reacional, a formação do TNB foi monitorada em um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum) a 412 nm em intervalos de 2s por 4 min. Para corrigir a formação de produto não-enzimático, também foi feita a leitura de poços com 40 μL de DMF 2,5% em tampão fosfato 1,0 mol.L^{-1} , pH 7,0 e 200 μL de mistura reacional (branco). Da

¹⁷I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D.H.W. Vlecken, I.J. Marques, D. Kubutat, J. Will, W.S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop, C.P.J. Bagowski, J. Med. Chem. 52 (2009) 763-770.

leitura dos poços controles e tratados com os compostos foi subtraída a leitura do branco. A atividade enzimática foi calculada como a diferença entre a absorbância observada entre 0 min e em 4 min (Δ Abs) de leitura. Os experimentos foram realizados em triplicata. As concentrações que inibem em 50% a atividade enzimática (CI_{50}) foram calculadas a partir da obtenção de curvas dose-resposta (Δ Abs vs log [inibidor]).

2.3.4 Estudos de interação com DNA plasmidial

Foi utilizada eletroforese em gel de agarose para identificar possíveis modificações resultantes da interação dos compostos com o DNA.⁷ 150 ng de DNA plasmidial pGEM®-T purificado (Promega-USA) foram incubados com os compostos (100 μ M) em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7,2) a 37 °C por 24 h. Em seguida, foi adicionada uma solução de leitura (50 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,01 % azul de bromofenol, 50 % de glicerol e 250 mM de EDTA). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de 1% de agarose imersa em tampão Tris-borato-EDTA 0,5X (TBE 0,5X) por 1 h a 75 mV. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução 2,5 μ g mL⁻¹ de brometo de etídeo em tampão TBE 0,5X por 30 min e o DNA foi visualizado por fluorescência em 312 nm.

2.3.5 Estudos de inibição da enzima Topoisomerase IB

O estudo de inibição da atividade enzimática da topoisomerase IB, foi realizado no Departamento de Biologia da Universidade de Roma Tor Vergata na Itália, em colaboração com a Prof.^o Dr. Alessandro Desideri.

2.3.5.1 Ensaio de relaxação do DNA

Topoisomerase IB (Topo IB) humana foi expressada e purificada conforme descrito anteriormente por Chillemi e colaboradores.¹⁸ Para determinar as unidades/mL da Topo IB, uma solução enzimática de 1 μ L foi diluída em solução tampão (20 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de Na₂EDTA, 10 mM de MgCl₂, 50 μ g/mL de BSA acetilado e 150 mM de KCl, pH 7,5) antes da adição de 0,5 μ g de DNA plasmidial pBlueScript KSII(+) super-enovelado (30 μ L de volume de reação). Uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para completar a relaxação de 0,5 μ g do DNA plasmidial super-enovelado em 30min a 37°C.

Com o intuito de avaliar o efeito dos complexos na atividade da enzima, diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas. As reações foram interrompidas após 1 h a 37 °C, com uma concentração final de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) de 0,5%. Os estudos de eletroforese foram realizados em uma cuba horizontal contendo gel de agarose 1% em 50 mM de Tris, 45 mM de ácido

¹⁸ G. Chillemi, P. Fiorani, S. Castelli, A. Bruselles, P. Benedetti, A. Desideri, Nucleic Acids Res. 33 (2005) 3339-3350.

bórico e 1 mM de EDTA. O gel foi então corado com brometo de etídeo (5 µg/mL), lavado com água e fotografado sob iluminação UV. Quando indicado, enzima e inibidor foram pré-incubados a 37 °C por 1 min, antes da adição do substrato. A mistura foi então incubada a 37 °C por 15 min.

2.3.5.2 Cinética de clivagem

O oligonucleótido CL14, (5'-GAAAAAAGACTTAG-3'), foi marcado com γ -³²ATP na sua extremidade 5', e pela adição de um excesso molar de 2 pares de cadeia complementar CP25 (5'-TAAAAATTTTTCTAAGTCTTTTTTC-3') produziu-se o "substrato suicida" (DNA). Foram incubadas 2,5 unidades de enzima com 20 nM do substrato suicida em tampão na ausência e na presença de 12 µM do complexo a 37°C. DMSO foi adicionado como controle. Antes da adição da proteína, foram removidos 5 µL da mistura reacional e utilizados como ponto de tempo zero. Em tempos diferentes, foram removidas alíquotas de 5 µL e adicionou-se 0,5% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) para interromper a reação. Todas as amostras foram precipitadas em etanol, digeridas com tripsina e analisadas por meio de eletroforese utilizando 7 M de ureia em 20% de gel de poliacrilamida. O experimento foi realizado em triplicata.¹⁹

2.3.5.3 Cinética de religação

O substrato CL14/CP25 (20 nM), preparado como descrito acima, foi incubado com 2,5 unidades de topo IB durante 30 min a 37 °C em tampão para permitir a formação do complexo clivado. Foi adicionado à solução DMSO ou 12 µM do complexo e as reações de religação foram iniciadas pela adição de um excesso molar de 200 vezes do oligonucleótido R11 (5'-AGAAAAATTTT-3') sobre CL14/CP25. Em tempos diferentes, foram removidas alíquotas de 5 µL e a reação foi interrompida com 0,5% de SDS. Todas as amostras foram precipitadas em etanol, digeridas com tripsina e analisadas por meio de eletroforese utilizando 7M de ureia em 20% de gel de poliacrilamida. O experimento foi realizado em triplicata.²⁰

2.3.5.4 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética

O ensaio foi realizado utilizando o DNA CL25/CP25 como substrato, obtido por CL25 marcado radioativamente (5'-GAAAAAAGACTTAGAAAAATTTTTTA-3') e por uma cadeia complementar de CP25. As reações foram realizadas utilizando o mutante catalítico inativo Tyr723Phe. O substrato (0,5 nM) foi incubado com a enzima na presença de DMSO, de 12 µM do complexo ou 50 µM de camptotecina em tampão a 37 °C durante 10 min, em um volume final de 30 µL. Adicionou-se 3 µL de

¹⁹ S. Vieira, S. Castelli, A. Desideri, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 76-82.

²⁰ I.E. Leon, J.F. Cadavid-Vargas, I. Tiscornia, V. Porro, S. Castelli, P. Katkar, A. Desideri, M. Bollati-Fogolin, S.B. Etcheverry, *J. Biol. Inorg. Chem.* 20 (2015) 1175-1191.

corante (0,25% de Azul de bromofenol e 40% (v/v) de glicerol) à solução e realizou-se a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 6% (v/v) por 4h. Condições da corrida: 40V em tampão TBE (Tris 12 mM, ácido bórico 11,4 mM e EDTA 0,2 mM) a 4°C. Como controle, o complexo, a uma concentração de 12 µM, foi incubado com o substrato.²¹

2.3.5.5 Docagem molecular

Os experimentos de ancoragem foram realizados utilizando Autodock 4.2 com MGLTools 1.5.6²² para preparar a estrutura do ligante e dos receptores. Os cálculos foram feitos com o algoritmo genético²³ e para cada experimento foram realizadas 250 execuções. A estrutura do receptor para o encaixe com a proteína livre foi retirada dos cristais 1A36²⁴ e 1EJ9²⁵, após a reconstrução dos resíduos que faltam como descrito anteriormente.²⁶ Após a eliminação do substrato de DNA, a estrutura da proteína foi utilizada para realizar o encaixe com a enzima livre. O cálculo com o complexo covalente foi realizado utilizando a estrutura do complexo binário 1K4S²⁷, como descrito anteriormente.²⁸ A eliminação das 12 bases do local de clivagem deu origem ao complexo covalente suicida proteína-DNA, utilizado no último experimento.

As coordenadas do complexo de cobre(II) (4) foram obtidas através da estrutura cristalográfica depositada em Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, CCDC 919666. O átomo de bromo, que não está presente na estrutura resolvida, foi adicionado ao composto e a estrutura foi regularizada utilizando o programa Sybyl (Tripos, St. Louis, MO) antes da conclusão do encaixe.

A análise dos contatos entre o ligante e o receptor foi executada utilizando uma versão modificada do programa g_mindist do pacote Gromacs 4.6²⁹, tomando um valor limiar de 3,5 Å. As imagens foram obtidas com o pacote de visualização VMD.³⁰

²¹ P. Katkar, A. Coletta, S. Castelli, G.L. Sabino, R.A. Couto, A.M. Ferreira, A. Desideri, *Metallomics* 6 (2014) 117-125.

²² G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785-2791.

²³ G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639-1662.

²⁴ L. Stewart, M.R. Redinbo, X. Qiu, W.G.J. Hol, J.J. Champoux, *Science* 279 (1998) 1534-1541.

²⁵ M.R. Redinbo, J.J. Champoux, W.G. Hol, *Biochemistry* 39 (2000) 6832-6840.

²⁶ G. Chillemi, I. D'Annessa, P. Fiorani, C. Losasso, P. Benedetti, A. Desideri, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5645-5651.

²⁷ B.L. Staker, K. Hjerrild, M.D. Feese, C.A. Behnke, A.B. Burgin, L. Stewart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 15387-15392.

²⁸ G. Mancini, I. D'Annessa, A. Coletta, G. Chillemi, Y. Pommier, M. Cushman, A. Desideri, *PLoS One* 7 (2012) e51354.

²⁹ B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E., Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435-447.

³⁰ W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph* 33 (1996) 27-28.

2.3.6 Estudos Teóricos

Os cálculos teóricos dos ligantes (**HL2**, **HL5**, **HL6** e **HL7**) e dos complexos **5-7** foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Hélio Anderson Duarte e com o pós-doutorando Alexandre Carvalho Bertoli (Grupo de Pesquisa em Química Inorgânica Teórica - UFMG).

Os cálculos foram realizados utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) por meio do pacote computacional Gaussian 09.³¹ As energias dos ligantes, dos complexos e das reações foram calculadas utilizando o funcional híbrido de troca e correlação (XC), com os três parâmetros de Becke combinados com a correlação de Lee, Yang e Parr (LYP), denominada B3LYP^{32,33} e o funcional (XC) de Perdew, Burke e Ernzerhof (PBE).^{34,35} A base LANL2DZ, que inclui o potencial de núcleo efetivo relativístico (ECP)³⁶ foi aplicada ao átomo de ouro, enquanto que o conjunto de base duplo zeta de Dunning/Huzinaga, D95³⁷ e cc-pVDZ³⁸ foram empregados para os demais átomos. As geometrias foram totalmente otimizadas sem restrições de simetria e as análises de frequência harmônica foram realizadas. As frequências reais asseguram que um mínimo na superfície de energia potencial foi encontrado.

³¹ Frisch, M.J., et al., Gaussian 09. 2009, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA.

³² A.D Becke, J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648-5652.

³³ C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, Physical Review B, 37 (1988) 785-789.

³⁴ J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Physical Review Letters, 77 (1996) 3865-3868.

³⁵ J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Physical Review Letters, 78 (1997) 1396-1396.

³⁶ P.J. Hay, W.R. Wadt, J. Chem. Phys. 82 (1985) 299.

³⁷ T.H. Dunning, Journal of Chemical Physics, 90 (1989) 1007-1023.

³⁸ D. E. Woon, T. H. Dunning, J. Chem. Phys. 98 (1993) 1358-1371.

Capítulo 3: Complexos de ouro(III), paládio(II) e platina(II) de 3-(4-bromofenil)-1-piridina-2-ilprop-2-en-1-ona tiossemicarbazona, HPyCT4BrPh, (HL1)

3.1. Caracterização dos compostos

Nesta parte do trabalho, foram obtidos complexos inéditos de 3-(4-bromofenil)-1-piridina-2-ilprop-2-en-1-ona tiossemicarbazona (HPyCT4BrPh, **HL1**) com ouro(III), platina(II) e paládio(II): [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl].0,5KCl (**2**) e [Pd(L1)Cl].KCl (**3**). A tiossemicarbazona (**HL1**) usada na síntese dos complexos já foi descrita na literatura.¹ Desta forma, seus espectros são utilizados neste capítulo apenas para comparação com os espectros dos complexos.

A fim de se obter uma comparação do efeito do metal na citotoxicidade, foi testado também, um complexo de cobre(II), [Cu(L1)Cl] (**4**) com o mesmo ligante tiossemicarbazona (**HL1**). Esse complexo de cobre foi previamente sintetizado e caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa.² Testes de estabilidade dos compostos, em solução, foram realizados por meio do ultravioleta-visível.

Realizaram-se testes de citotoxicidade frente a células leucêmicas (HL-60; Jurkat, THP-1), células de tumor sólido de carcinoma (MDA-MB 231) e adenocarcinoma mamário (MCF-7), e frente a células de carcinoma de cólon retal (HCT-116). Foram realizados estudos de interação dos complexos com o DNA por meio de eletroforese e estudos de inibição das enzimas Tiorredoxina Redutase (TrxR) e Topoisomerase, como uma forma preliminar de determinar seus possíveis alvos biológicos.

3.1.1. Análises

Na Tabela 3.1 estão apresentados os dados de rendimento experimental, ponto de fusão, análise elementar, massa molar e condutividade molar para o ligante livre e seus complexos.

As análises condutimétricas (DMF, 1×10^{-3} mol.L⁻¹) indicam que o complexo de ouro(III) apresenta-se como eletrólito do tipo 1:1 e os complexos de paládio(II) e platina(II) são não eletrólitos ou eletrólitos fracos.³ Os valores obtidos para as microanálises e condutividades molares sugerem a formação dos complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) e [Pd(L1)Cl]KCl (**3**), onde L1 é o ligante tiossemicarbazona na sua forma aniônica. No complexo (**1**), a tiossemicarbazona e um íon cloreto estão coordenados ao centro metálico, enquanto um cloreto age como contra-íon. Nos complexos (**2**) e (**3**) a tiossemicarbazona se liga ao metal juntamente com um ligante cloreto. Em (**2**) se tem a presença de 0,5 KCl de cristalização e em (**3**) há 1 KCl de cristalização.

¹J.G. Silva, C.C.H. Perdigoão, N.L. Speziali, H. Beraldo, J. Coord. Chem. 66 (2013) 385-401.

²J. G. Da Silva, A. A. R. Despaigne, S. R. W. Louro, C. C. Bandeira, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 65 (2013) 415-426.

³W.J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81-122.

Tabela 3.1: Dados de caracterização da tiossemicarbazona HPyCT4BrPh (**HL1**) e seus complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) e [Pd(L1)Cl]KCl (**3**).

Composto	Rend. (%)	Ponto de fusão ^a (°C)	Análise Elementar*			MM (g.mol ⁻¹)	ΛM ^b
			%C	%H	%N		
HL1	75	199-201	49,75 (49,87)	3,85 (3,63)	15,21 (15,51)	361,27	-
(1)	72	174-175	28,70 (28,68)	2,01 (1,93)	8,81 (8,92)	628,12	71,8
(2)	81	225-227	28,23 (28,69)	2,10 (1,93)	8,72 (8,92)	628,06	19,0
(3)	72	Dec.>300	30,88 (31,24)	2,32 (2,10)	9,64 (9,72)	576,67	16,0

*Os valores teóricos estão entre parênteses; ^aDecompõe: dec.; ^b cm² Ω⁻¹ mol⁻¹

A Figura 3.1 mostra as propostas estruturais para o ligante HPyCT4BrPh (**HL1**) e para os complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) e [Pd(L1)Cl]KCl (**3**), com base nos dados da Tabela 3.1 e nos espectros de RMN e IV (ver discussão a seguir).

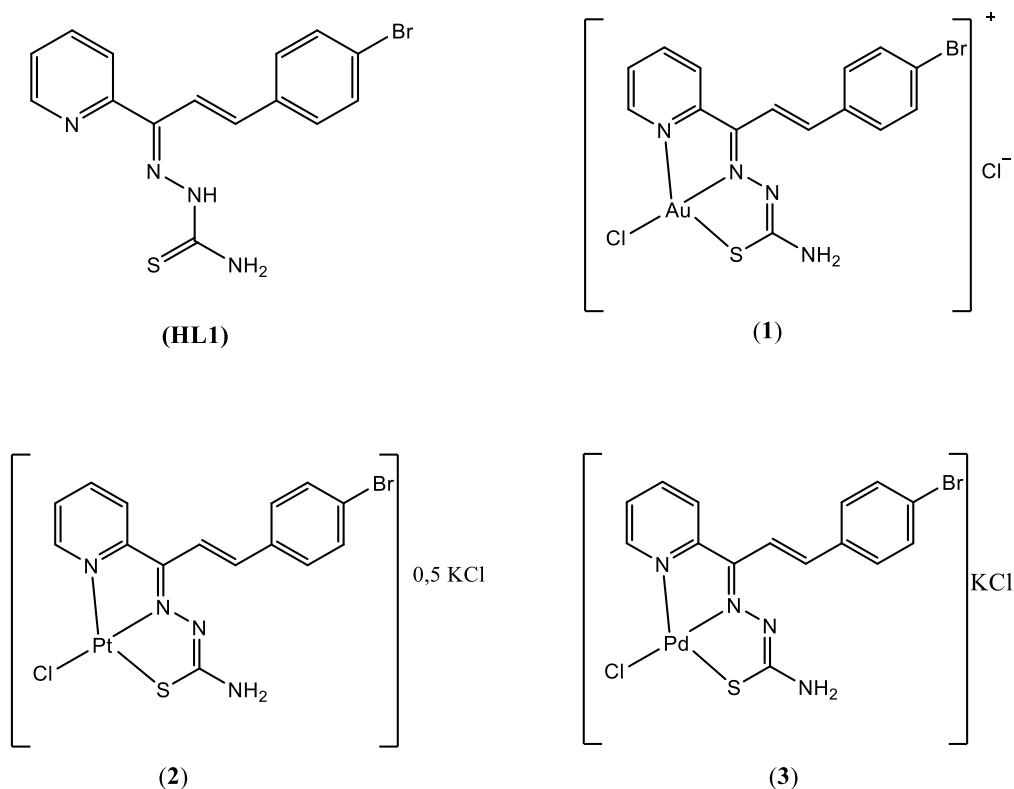


Figura 3.1: Estruturas propostas para o ligante HPyCT4BrPh (**HL1**) e os complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), e [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) [Pd(L1)Cl]KCl (**3**).

3.1.2. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Os complexos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC. Apesar de o complexo de ouro(III) ser solúvel em $\text{DMSO-}d_6$, este reage com o solvente, e dessa forma o espectro para esse complexo foi obtido também em $\text{MEOH-}d_4$. Para os outros complexos, os espectros foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$. O ligante apresenta baixa solubilidade em metanol, e assim não é possível avaliar os deslocamentos dos sinais para o complexo de ouro(III). Para os demais complexos, verificam-se variações nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C similares, em comparação com os espectros do ligante.

Para o ligante, após a dissolução em $\text{DMSO-}d_6$, observa-se a presença de sinais duplicados, indicando a presença de isômeros E e Z (Figura 3.2).

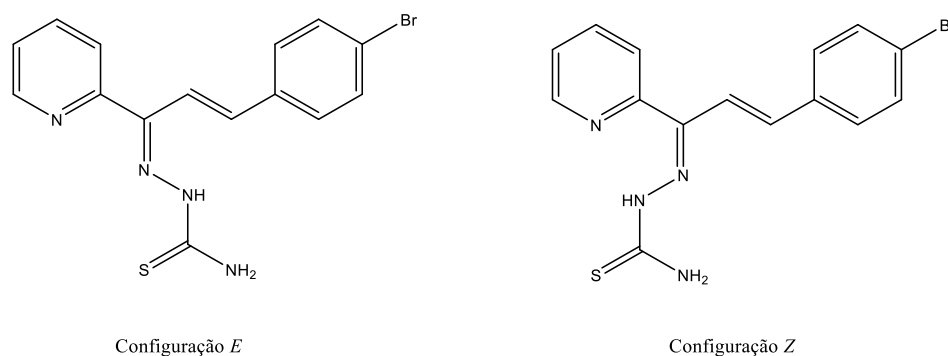


Figura 3.2: Representação dos isômeros configuracionais E e Z de HPyCT4BrPh (**HL1**).

A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos da tiossemicarbazona é apresentada na Figura 3.3.

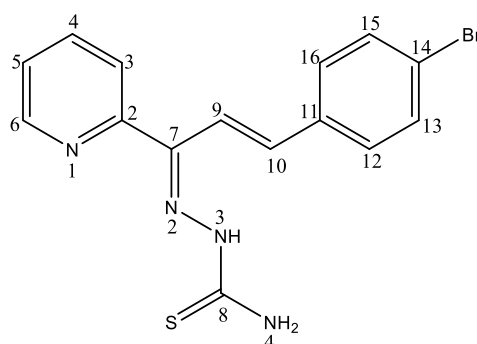


Figura 3.3: Representação estrutural de HPyCT4BrPh (**HL1**) e numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes.

Conforme apresentado na Tabela 3.2, os sinais em δ 13,07 e δ 11,44 são atribuídos ao hidrogênio N(3)-H nas configurações Z e E, respectivamente.

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos, observou-se apenas um sinal para cada hidrogênio, o que sugere a presença apenas da configuração do isômero *E* em solução. Verifica-se também o desaparecimento do sinal referente a N(3)-H, indicando que a tiossemicarbazona encontra-se coordenada ao metal na sua forma desprotonada. Além disso, os sinais de todos os hidrogênios sofreram significativos deslocamentos após a coordenação. Nos espectros de RMN de ^{13}C os sinais de C(7)=N, C(8)=S e dos carbonos da piridina se deslocaram de forma significativa, em concordância com a coordenação através do sistema N_{py}-N-S. Esses dados estão apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2: Atribuições, deslocamentos químicos (ppm) e multiplicidade ^a dos principais sinais de RMN de ^1H (a 400 MHz) de HPyCT4BrPh (**HL1**) e dos complexos de [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) e [Pd(L1)Cl]KCl (**3**).^b

Atribuição	δ				
	HL1 <i>E</i>	HL1 <i>Z</i>	(1)	(2)	(3)
H3	7,85-7,51 (m)	8,87-8,72 (m)	10,18-10,05 (m)	8,11 (d, <i>J</i> =8,0)	8,14 (d, <i>J</i> =3,6)
H4	7,85-7,51 (m)	7,85-7,51 (m)	9,57-9,50 (m)	8,17 (t, <i>J</i> =7,3)	8,14 (d, <i>J</i> =3,6)
H5	8,34-8,03 (m)	8,34-8,03 (m)	9,34-9,12 (m)	7,7 (t, <i>J</i> =9,6)	7,63 (d, <i>J</i> =8,4)
H6	8,87-8,72 (m)	7,37(m)	10,64 (d, <i>J</i> =7,5)	8,86 (d, <i>J</i> =4,8)	8,61 (d, <i>J</i> =5,1)
H9	7,13 (s)	7,13 (s)	8,99 (s)	7,17(d, <i>J</i> =16,3)	7,20 (d, <i>J</i> =16,3)
H10	7,85-7,51 (m)	8,34-8,03 (m)	10,18-10,05 (m)	8,36-8,28 (m)	8,14 (d, <i>J</i> =3,6)
H(12,16)	7,85-7,51 (m)	7,85-7,51 (m)	9,34-9,12 (m)	7,70 (m)	7,70 (d, <i>J</i> =8,4)
H(13,15)	7,85-7,51 (m)	7,85-7,51 (m)	9,34-9,12 (m)	7,62 (m)	7,63 (d, <i>J</i> =8,4)
N(3)-H	11,44(s)	13,07(s)	-	-	-
H-N(4)H	8,63(s) 8,62(s)	8,68(s) 8,34-8,03 (m)	10,18-10,05 (m)	8,36-8,28 (m)	8,22 (d, <i>J</i> =16,2)

^aMultiplicidade: s=singleteo; d=dupleteo; t=tripleto; m=multiploteo; ^b O espectro do complexo (**1**) foi obtido em MeOH-*d*₆, para os demais compostos, os espectros foram obtidos em DMSO-*d*₆.

Tabela 3.3: Atribuições e deslocamentos químicos (ppm) dos principais sinais de RMN de ^{13}C e subespectros DEPT135 de HPyCT4BrPh (**HL1**) e os complexos (**2**) e (**3**) (DMSO- d_6 , 100 MHz).

Atribuição	δ							
	HL1				(2)		(3)	
	<i>E</i>		<i>Z</i>					
	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT
C2	155,4	-	151,1	-	159,5	-	158,2	-
C3	s.s*	s.s*	s.s*	s.s*	125,4	↑	124,9	↑
C4	s.s*	s.s*	s.s*	s.s*	140,8	↑	140,9	↑
C5	s.s*	s.s*	s.s*	s.s*	126,3	↑	125,6	↑
C6	148,7	↑	145,7	↑	146,4	↑	148,0	↑
C7=N	141,2	-	s.s*	-	147,9	-	147,7	-
C8=S	179,2	-	178,2	-	186,0	-	183,0	-
C11	135,7	-	135,1	-	135,9	-	135,6	-
C14	121,4	-	122,6	-	122,8	-	122,8	-

s.s*= sinais sobrepostos

O espectro de RMN de ^1H do complexo (**3**) está representado na Figura 3.4. Após a região de 9,0 ppm, não se observou mais nenhum sinal, o que sugere a desprotonação do ligante quando complexado ao metal, pois, o hidrogênio N(3)-H foi observado como um sinal muito desblindado em 11,44 ppm no espectro do ligante livre.¹

Na Figura 3.5 estão representados os espectros de RMN de ^{13}C do ligante livre **HL1** e do complexo (**3**). Observa-se no complexo, um deslocamento significativo dos sinais referentes a C2, C7 e C8, em concordância com a coordenação ao enxofre, nitrogênio imínico e ao nitrogênio heteroaromático, o que sugere, que no complexo, o ligante adota a forma isomérica *E*. Na tiossemicarbazona livre, os sinais referentes a esses carbonos aparecem em 155,4 (C2), 141,2 (C7) e 179,2 (C8) ppm, e nos complexos de paládio e platina, esses sinais são observados em 158,2 e 159,5 (C2); 147,7 e 147,9 (C7); 183,0 e 186,0 (C8) ppm respectivamente. Este mesmo comportamento foi observado para complexos de paládio e platina com outras tiossemicarbazonas.⁴

⁴A.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) 698-706.

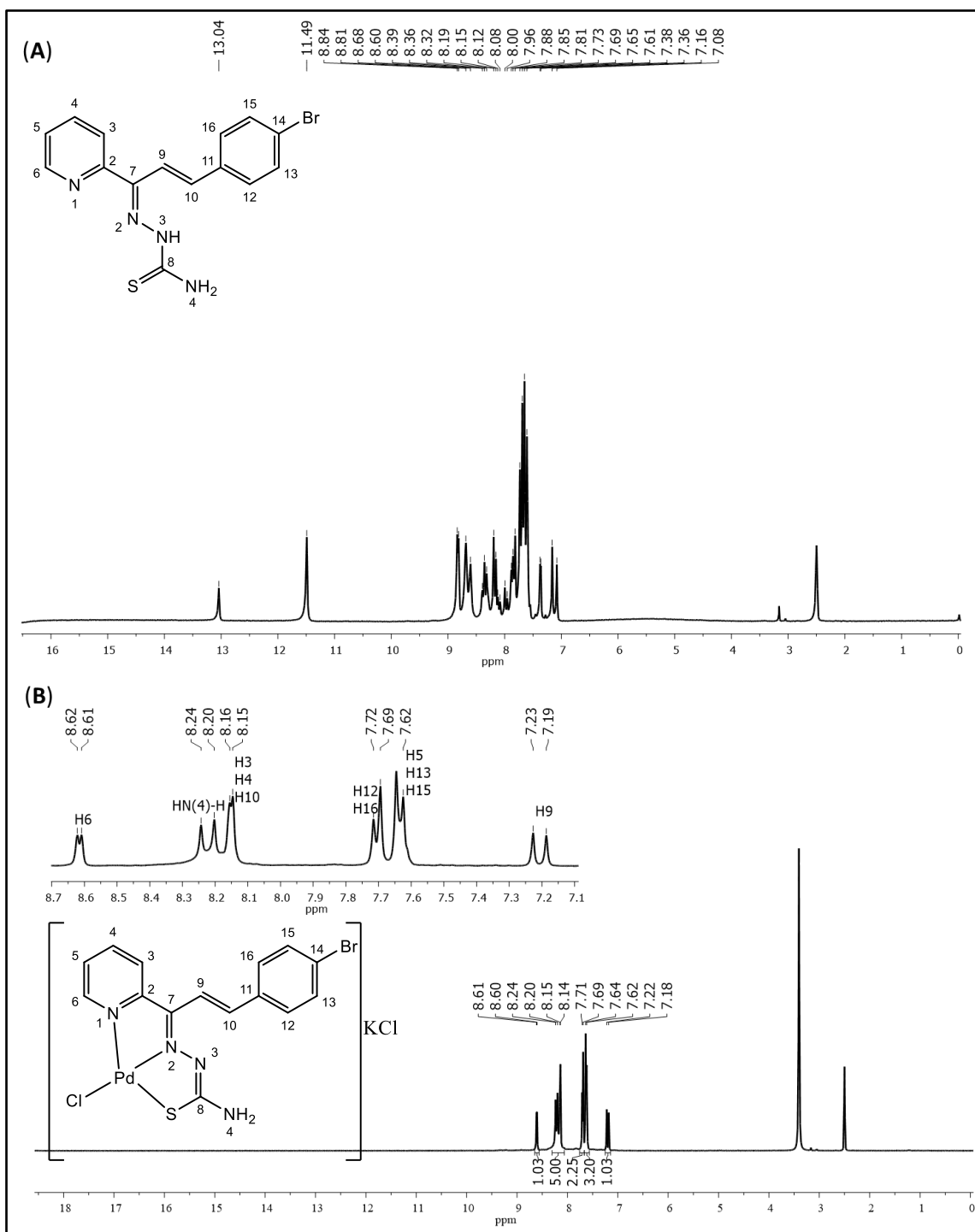


Figura 3.4: Espectros de RMN de ^1H (400MHz) de: (A) HPyCT4BrPh (HL1) e (B) [Pd(L1)Cl]KCl (3) obtidos em DMSO- d_6 .

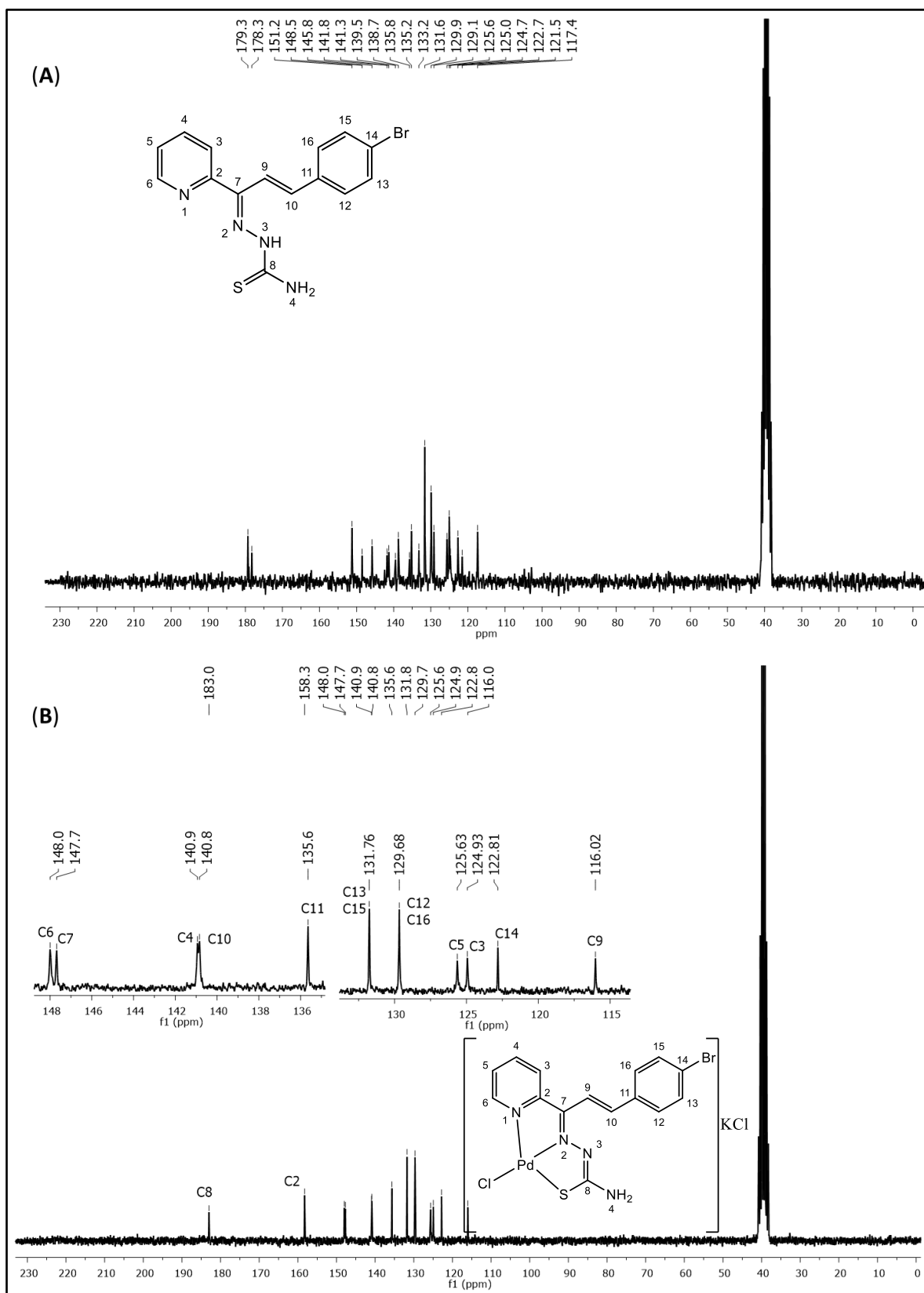


Figura 3.5: Espectros de RMN de ^{13}C (a 100 MHz) de: (A) HPyCT4BrPh (HL1) e (B) [Pd(L1)Cl]KCl (3) obtidos em DMSO- d_6 .

3.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Na Tabela 3.4 estão apresentados os números de onda máximos das bandas mais importantes observadas nos espectros vibracionais da tiossemicarbazona livre e dos complexos **(1)**, **(2)** e **(3)** na região de 4000-400 cm^{-1} . A banda atribuída ao estiramento da ligação (C=N) em 1560 cm^{-1} no espectro da tiossemicarbazona deslocou-se para 1610-1600 cm^{-1} nos espectros dos complexos, em concordância com a coordenação via nitrogênio azometínico.^{5,6,7} A banda observada em 780 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação (C=S) no espectro da tiossemicarbazona livre, deslocou-se para 776-722 cm^{-1} nos complexos, indicando a coordenação pelo enxofre. Esse deslocamento é compatível com a complexação de enxofre de tiolato. A coordenação do nitrogênio heteroaromático pode ser comprovada pelo deslocamento da banda atribuída à deformação no plano do anel da piridina em 618 cm^{-1} no espectro do ligante, para 670-660 cm^{-1} nos complexos.^{8,9}

Nos espectros dos complexos, a ausência da banda referente ao estiramento N-H, observada em 3158-3314 cm^{-1} para a tiossemicarbazona livre, indica a desprotonação após a coordenação.¹⁰ Dessa forma, os dados dos espectros de infravermelho indicam que nos complexos, a tiossemicarbazona se liga ao metal na forma aniônica, através do sistema quelato Npy-N-S. Na figura 3.6 estão representados os espectros de absorção na região do infravermelho para o ligante (**HL1**) e o complexo **(2)**.

Tabela 3.4: Atribuições das principais bandas (v/cm^{-1}) de absorção na região do infravermelho de **HL1** e seus complexos **(1)**, **(2)** e **(3)**.

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C-S})$	$\rho(\text{py})$
HL1	3158-3314	1560	780	618
(1)	-	1600	722	670
(2)	-	1604	774	668
(3)	-	1610	776	660

⁵J.A. Lessa, M.A. Soares, R.G. dos Santos, I.C. Mendes, L.B. Salum, H.N. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, H. Beraldo, *Biometals* 26 (2013) 151-165.

⁶K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C.M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 315-321.

⁷H. Beraldo, W.F. Nacif, L.R. Teixeira, J.S. Rebouças, *Transit. Metal. Chem.* 27 (2002) 85-88.

⁸I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. Santos, P.R.O. Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1454-1461.

⁹D.X. West, J.S. Ives, J. Krejci, M.M. Salberg, T.L. Zumbahlen, G.A. Bain, A.E. Liberta, *Polyhedron* 14 (1995) 2189-2200.

¹⁰K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Da Silva, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, *J. Mol. Struct.* 1008 (2012) 102-107.

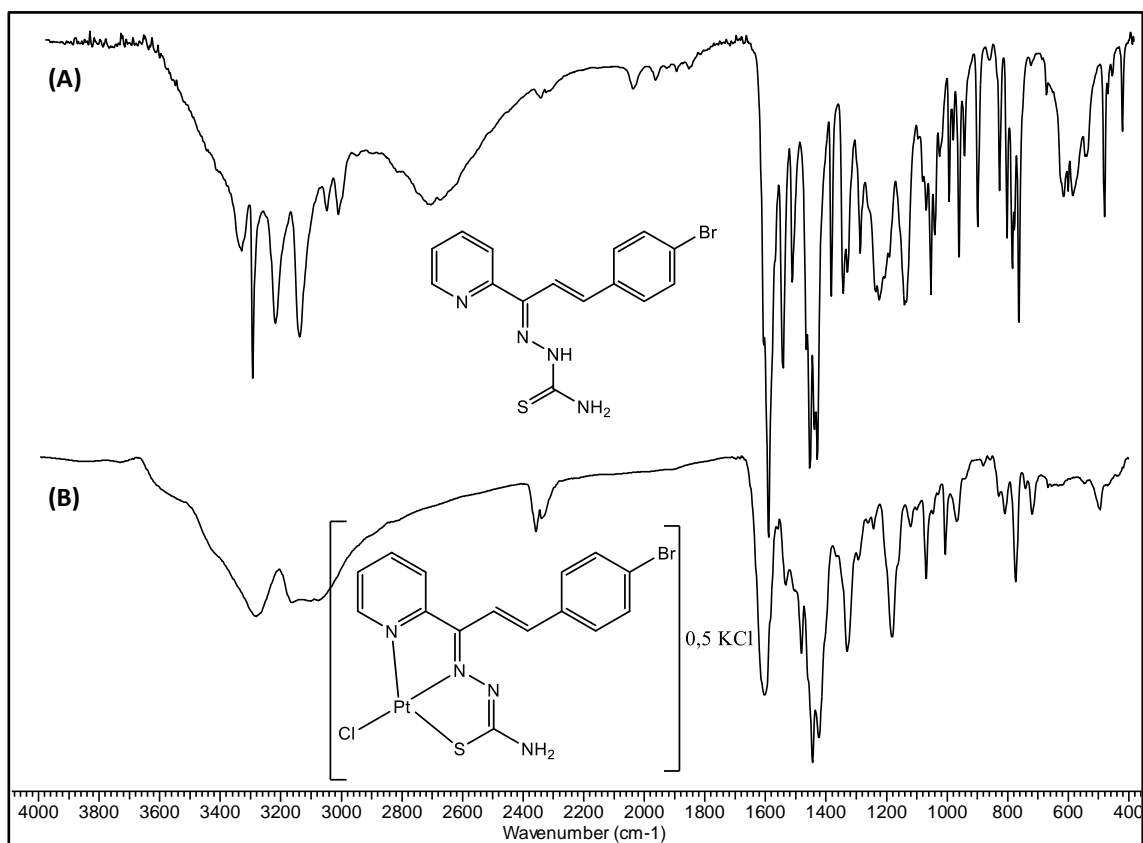


Figura 3.6: Espectros de absorção na região do infravermelho: (A) HPyCT4BrPh (**HL1**) e (B) [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) obtidos em pastilha de KBr.

3.2 Avaliação da atividade biológica da tiossemicarbazona e seus complexos

3.2.1 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos compostos foi testada 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 colo-retal), e VERO (rim de macaco verde, usada como modelo de células não tumorais). Juntamente com os complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) e [Pd(L1)Cl]KCl (**3**), foram testados a tiossemicarbazona livre, HPyCT4BrPh (**HL1**), e os sais utilizados nas sínteses dos complexos: H₃AuCl₄.3H₂O; K₂PdCl₄; K₂PtCl₄. Foi testado também, o complexo de cobre(II), [Cu(L1)Cl] (**4**) e o sal CuCl₂, utilizado na síntese.

A triagem das substâncias foi realizada a 1 μM e apenas as substâncias que apresentaram atividade significativa foram posteriormente submetidas à determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CI₅₀). Como controle positivo, utilizou-se a cisplatina e o etoposídeo. Os valores de CI₅₀ para o complexo [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**) e para os sais metálicos utilizados não foram determinados, pois, na triagem esses compostos apresentaram atividade citotóxica inferior a 50%. A literatura reporta

dados em que complexos de platina(II) e paládio(II) com algumas tiossemicarbazonas tridentadas apresentam um comportamento semelhante de diminuição da atividade citotóxica em relação ao ligante livre. Esse fato pode ser explicado devido à presença de apenas um cloreto lábil na esfera de coordenação do metal para ser liberado, permitindo assim a ligação da platina ao DNA por apenas um sítio de coordenação.¹¹

Os valores de CI_{50} contra as seis linhagens celulares estão apresentados na Tabela 3.5. Em geral, observa-se que o complexo de cobre(II) foi o mais ativo. No entanto, o complexo de ouro(III) revelou ser tão promissor quanto o complexo de cobre(II) contra a linhagem MDA-MB 231. A coordenação com cobre(II) melhorou a atividade contra a maioria das células testadas em comparação com a tiossemicarbazona livre. A coordenação com o ouro(III) fez melhorar a atividade contra as linhagens celulares Jurkat, THP-1, MDA-MB 231, MCF-7 e HCT-116. O complexo de paládio(II) (**3**) não foi ativo até 1 μ M contra nenhuma das linhagens testadas. Em geral, para os tumores sólidos, os complexos (**1**) e (**4**) e o ligante **HL1** foram mais ativos que a cisplatina.

O complexo de cobre(II) apresentou melhor atividade contra as células Jurkat, THP-1 e MCF-7, sendo de 6 a 13 vezes mais ativo que o ligante livre. O complexo $[Au(L1)Cl]Cl$ (**1**) foi cerca de quatro vezes mais ativo que o ligante contra células leucêmicas Jurkat e mostrou-se mais ativo que a tiossemicarbazona frente a todas as células com exceção de HL-60. Além disso, os resultados indicaram que os compostos em estudo foram menos citotóxicos na célula sadia VERO do que nas linhagens celulares tumorais testadas.

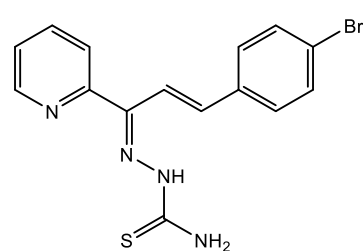
O complexo de cobre(II), mais ativo, foi também mais tóxico para as células Vero não tumorais do que de ouro(III). Assim, o composto de ouro(III) desperta interesse. De qualquer modo, uma investigação sobre os possíveis alvos biológicos do complexo de ouro(III) mostra-se de extrema relevância para o planejamento futuro de outros complexos desse metal que apresentem seletividade.

¹¹K.O.S. Ferraz, L.Ferandes, D.Carrilho, M. C. X. Pinto, M. de Fátima Leite, E. M. Souza-Fagundes, N. L. Speziali, I. C. Mendes, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7138–7144.

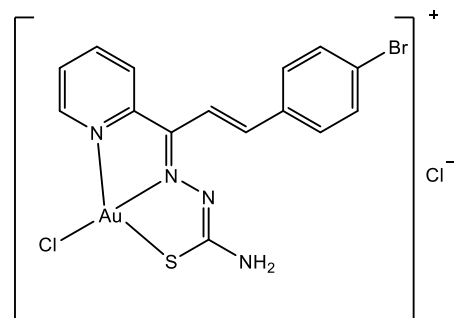
Capítulo 3: Complexos de Au(III), Pd(II) e Pt(II) com tiossemicarbazona derivada da chalcona

Tabela 3.5: Efeito citotóxico (CI₅₀) da tiossemicarbazona HPyCT4BrPh (**HL1**) e dos complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pd(L1)Cl]KCl (**3**) e [Cu(L1)Cl] (**4**) e fármacos antitumorais (etoposídeo e cisplatina) nas linhagens celulares HL60, Jurkat, THP-1, MDA-MB 231, MCF-7, HCT-116 e Vero. Os dados são expressos como média ± erro padrão.

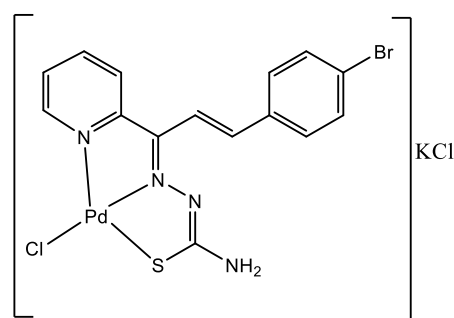
Compostos	Valores de CI ₅₀ (μM)						
	HL60	Jurkat	THP-1	MDA-MB 231	MCF-7	HCT-116	VERO
HL1	0,04 (± 0,02)	2,92 (± 0,91)	1,27 (± 0,32)	0,25 (± 0,11)	1,23 (± 0,25)	0,22 (± 0,08)	>10
(1)	0,26 (± 0,20)	0,80 (± 0,23)	0,62 (± 0,49)	0,09 (± 0,05)	0,42 (± 0,01)	0,10 (± 0,05)	>1
(3)	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
(4)	0,01 (± 0,01)	0,21 (± 0,06)	0,20 (± 0,06)	0,15 (± 0,01)	0,16 (± 0,06)	0,02 (± 0,02)	0,36 (± 0,23)
Cisplatina	0,023 (± 0,014)	0,266 (± 0,085)	0,015 (± 0,011)	>100	>100	>100	13,045 (± 0,629)
Etoposídeo	0,855 (± 0,389)	6,499 (± 1,862)	2,751 (± 1,062)	>100	>100	>100	>100



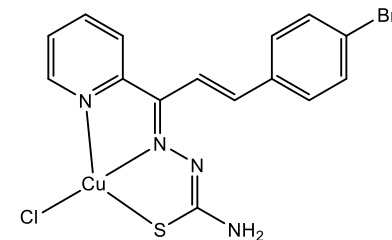
(HL1)



(1)



(3)



(4)

3.2.2 Inibição da atividade enzimática da Tiorredoxina Redutase (TrxR)

A TrxR está envolvida em uma das etapas de biossíntese do DNA^{12,13} e a literatura relata que complexos de diferentes metais, em particular os de ouro, provocam a inibição da atividade catalítica da TrxR.¹⁴ Dessa forma, a inibição da enzima foi considerada um potencial mecanismo para a atividade antiproliferativa do complexo **(1)**. Assim, foram investigadas as atividades inibitórias *in vitro* da TrxR promovida por **(1)**, H₂AuCl₄ e auranofina através do ensaio de redução do ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB). A fim de se comparar o efeito dos metais frente à enzima, investigou-se também a atividade inibitória *in vitro* da TrxR promovida pelo complexo **(4)** e o sal CuCl₂. Os complexos **(2)** e **(3)** não foram testados pois não apresentaram atividade citotóxica.

Foi feito um screening na concentração de 10 µM, para medir a capacidade dos complexos **(1)** e **(4)** de inibir a atividade da TrxR. Os efeitos dos dois complexos sobre a atividade catalítica da enzima foram comparados com os de H₂AuCl₄, CuCl₂ e auranofina (Figura 3.7). Nas condições do experimento, **1** inibiu em 77,9% a atividade da TrxR, enquanto que H₂AuCl₄ e auranofina promoverem inibição de 97,5 % e 95,2%, respectivamente. O ligante (**HL1**) e o sal CuCl₂, não inibiram a atividade da TrxR nessa concentração. O complexo **(4)** inibiu em 49,7% a atividade da enzima. A partir desses resultados preliminares, houve um estímulo em se obter os valores da concentração necessária para inibir em 50% a atividade da enzima (CI₅₀) para os compostos selecionados.

Para a determinação do CI₅₀, variou-se a concentração, totalizando 13 concentrações diferentes, entre 50µM - 0,005µM. O complexo **(1)** inibiu a atividade enzimática, sendo que o valor de CI₅₀ foi igual a 5,55 µM (intervalo de confiança 95% = 5,109 a 6,032 µM), sugerindo que a TrxR é um possível alvo biológico para a ação citotóxica do complexo. O valor de CI₅₀ da auranofina foi igual a 0,30 µM (intervalo de confiança 95% = 0,2720 a 0,3202 µM), e o CI₅₀ de H₂AuCl₄ foi 0,62 µM (intervalo de confiança 95% = 0,5938 a 0,6509 µM). Para o complexo **(4)** o valor do CI₅₀ foi igual a 9,63 µM (intervalo de confiança 95% = 7,693 a 12,060 µM).

¹²C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M.P. Rigobello, Free Radical Biol. Med. 42 (2007) 872-881.

¹³R. Rubbiani, I. Kitanovic, H. Alborzina, S. Can, A. Kitanovic, L.A. Onambele, M. Stefanopoulou, Y. Geldmacher, W.S. Sheldrick, G.A. Prokop, S. Wölfl, I. Ott, J. Med. Chem. 53 (2010) 8608-8618.

¹⁴J.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) 587-598.

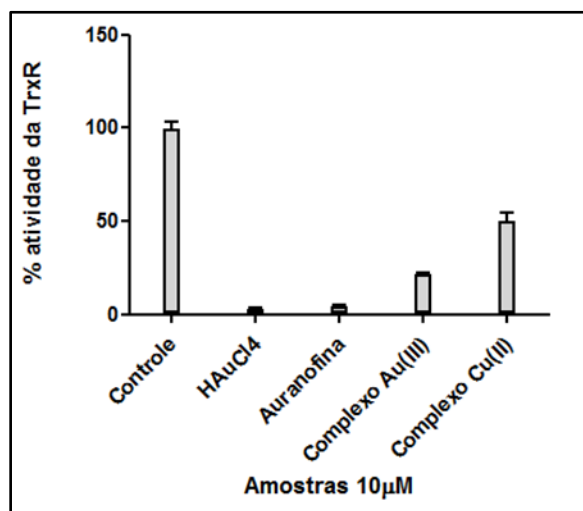


Figura 3.7: Efeito inibitório de HAuCl₄, auranofina, [Au(L1)Cl]Cl (**1**) e Cu(L1)Cl (**4**), sobre a atividade da TrxR. A enzima foi incubada com DMF 2,5% (controle) e com os compostos na concentração de 10μM por 1h a 37 °C. A atividade da TrxR foi avaliada pelo ensaio do DTNB. Os dados são expressos como média ± erro padrão da atividade da TrxR.

O efeito inibitório da TrxR parece estar relacionado à presença do íon metálico. No entanto, embora HAuCl₄ iniba a atividade da enzima, o composto não exibiu atividade citotóxica contra as linhagens celulares testadas HL-60, Jurkat, THP-1, MDA-MB-231, MCF-7 e HCT-116. O caráter hidrofílico de HAuCl₄ provavelmente impede sua passagem pela membrana celular. Este comportamento é diferente daquele do complexo (**1**), que além de inibir a atividade da TrxR, apresentou efeito citotóxico, sugerindo que a tiossemicarbazona HPyCT4BrPh (**HL1**), além de seu efeito citotóxico intrínseco, também atuou como carreador do íon ouro para o interior das células. É possível que o efeito citotóxico do complexo (**1**) possa ser mediado por ambos, o ouro e a tiossemicarbazona, através da dissociação do complexo, conforme sugerido por outros autores.^{15,16} Assim, o complexo (**1**) poderia conter duas entidades as quais atuariam sobre diferentes alvos em um mesmo composto: a tiossemicarbazona, cujo alvo biológico é a enzima Ribonucleosídeo Difosfato Redutase (RDR) e o íon ouro(III), o qual atuaria sobre a TrxR. No caso do complexo (**4**), uma vez que o sal CuCl₂ não inibiu a enzima, a atividade inibitória é atribuída ao complexo em si.

¹⁵ A.N. Wein, A.T. Stockhausen, K.I. Hardcastle, M.R. Saadein, S. Peng, D. Wang, D.M. Shin, Z. Chen, J.F. Eichler, J.Inorg. Biochem. 105 (2011) 663-668.

¹⁶L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, J.Med. Chem. 43 (2000) 3541-3548.

3.2.3 Estudos de interação com DNA plasmidial

Foi realizado um estudo de interação dos compostos estudados com o DNA, como forma de avaliação de um possível alvo biológico para a citotoxicidade. Foram testados a tiossemicarbazona (**HL1**), o complexo $[\text{Au}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**), que foi o mais citotóxico da série de compostos sintetizados, e HAuCl_4 . A fim de comparação, foram também testados o complexo $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]$ (**4**) e CuCl_2 . Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 3.8.

O efeito dos compostos sobre a conformação do DNA foi avaliado por mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC-19 após tratamento com os compostos. Na concentração de 100 μM , os complexos (**1**) e (**4**), assim como o ligante (**HL1**), HAuCl_4 e CuCl_2 não alteraram significativamente a mobilidade eletroforética do DNA. Também não foi observada clivagem do DNA na presença dos compostos estudados.

Assim, os estudos revelaram que os compostos não interagem diretamente com o DNA, ou, se interagem, não formam adutos estáveis. Portanto, o efeito antiproliferativo observado nas células tumorais não ocorre por meio da interação direta desses compostos com o DNA.

Na cisplatina, um decréscimo na mobilidade eletroforética foi observado em todas as formas, o que deve estar associado a uma interação com o DNA formando ligações cruzadas intrafitas. De fato, o mecanismo de ação citotóxica de tiossemicarbazonas livres envolve principalmente a inibição de RDR⁶, e não a interação direta com o DNA. No caso dos complexos aqui investigados estes resultados sugerem que o mecanismo de sua ação citotóxica não deve envolver ligação direta do metal à biomolécula.

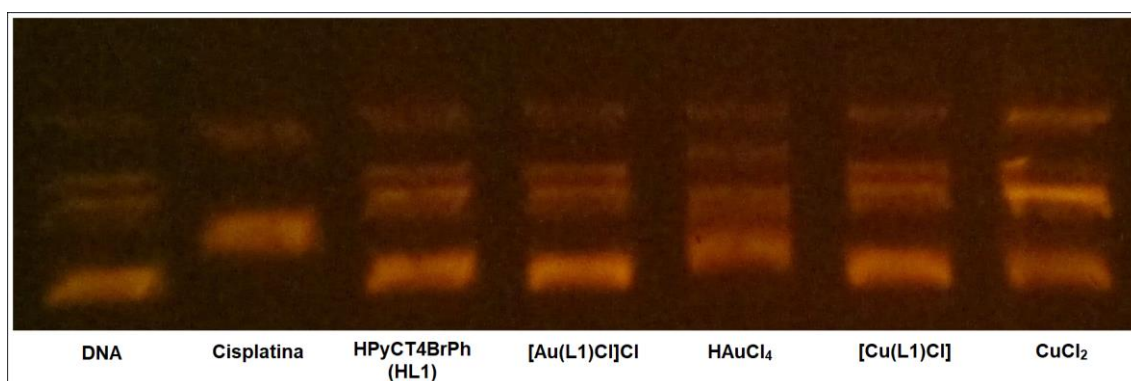


Figura 3.8: Estudo de eletroforese em gel de agarose com o DNA plasmidial pUC19, tratado com cisplatina, HPyCT4BrPh (**HL1**), $[\text{Au}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) e $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]$ (**4**), HAuCl_4 , CuCl_2 , a 100 μM em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Período de incubação 24h a 37 °C.

3.2.4 Inibição da atividade enzimática da Topoisomerase IB

A topoisomerase IB (Topo IB) é de grande interesse e a síntese de inibidores dessa enzima tem sido relatada na literatura.^{17,18} A enzima catalisa eficientemente a relaxação do DNA super-enovelado. Desta forma, o efeito inibitório dos compostos na atividade da Topo IB foi estudado por meio de ensaio de eletroforese em gel de agarose, comparando a diferença na mobilidade do DNA plasmidial super-enovelado e das formas relaxadas de DNA.

Complexos quadrado-planos com configuração d^8 exibem promissora atividade antitumoral. Um complexo com essas características, se aprovado em testes clínicos, teria o potencial para substituir ou para ser administrado em conjunto com a cisplatina.^{19,20} Os complexos aqui estudados apresentam então uma grande relevância.

Os compostos testados foram a tiossemicarbazona (**HL1**), $[\text{Au}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**), HAuCl_4 , $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]$ (**4**) e CuCl_2 .

O complexo $[\text{Au}(\text{L1})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) inibiu a topo IB de forma dose-dependente, a partir da concentração 1,5 μM . A inibição foi completa quando a concentração do complexo atingiu 50-100 μM , conforme se pode ver na Figura 3.9 (A), pela intensidade da banda correspondente ao DNA super-enovelado (“supercoiled”) e pela ausência da banda correspondente aos topoisômeros. O efeito inibitório do complexo (**1**) é aumentado quando o composto é pré-incubado com a enzima por 5 minutos antes da adição do DNA. Nessas condições, a concentração de 1,5 μM é suficiente para inibir completamente a atividade enzimática. (Figura 3.9 (C)). É importante observar que HAuCl_4 sozinho foi capaz de inibir a topo IB, mas nesse caso a inibição não é completa até a concentração testada 400 μM (Figura 3.9 (B)). A pré-incubação da enzima com HAuCl_4 antes da adição de DNA faz aumentar o efeito, indicando que o ouro interage em algum local da enzima reduzindo sua habilidade de relaxar o DNA. (Figura 3.9 (D)). Comparando os experimentos da inibição de topo IB dose-dependente nas presenças de HAuCl_4 e do complexo (**1**) pode-se dizer que a coordenação do ouro com a tiossemicarbazona fez melhorar a atividade inibitória do ouro 8 a 16 vezes (Figura 3.9 comparar (A) e (B)).

Conforme verificado na Figura 3.10, a atividade enzimática é pouco afetada pelo aumento da concentração de HPyCT4BrPh (**HL1**), onde não se observou um efeito inibitório até a concentração testada de 50 μM , Figura 3.10 (A) (colunas 4-10).

¹⁷ S. Castelli, O. Vassallo, P. Katkar, C.M. Che, R.W.Y. Sun, A. Desideri, Arch. Biochem. Biophys. 516 (2011) 108-112.

¹⁸ S. Vieira, S. Castelli, A. Desideri, Int. J. Biol. Macromol. 81 (2015) 76-82.

¹⁹ K.S. Lovejoy, S.J. Lippard, Dalton Trans. (2009) 10651-10659.

²⁰ R.W. Sun, D.L. Ma, E.L. Wong, C.M. Che, Dalton Trans. (2007) 4884-4892.

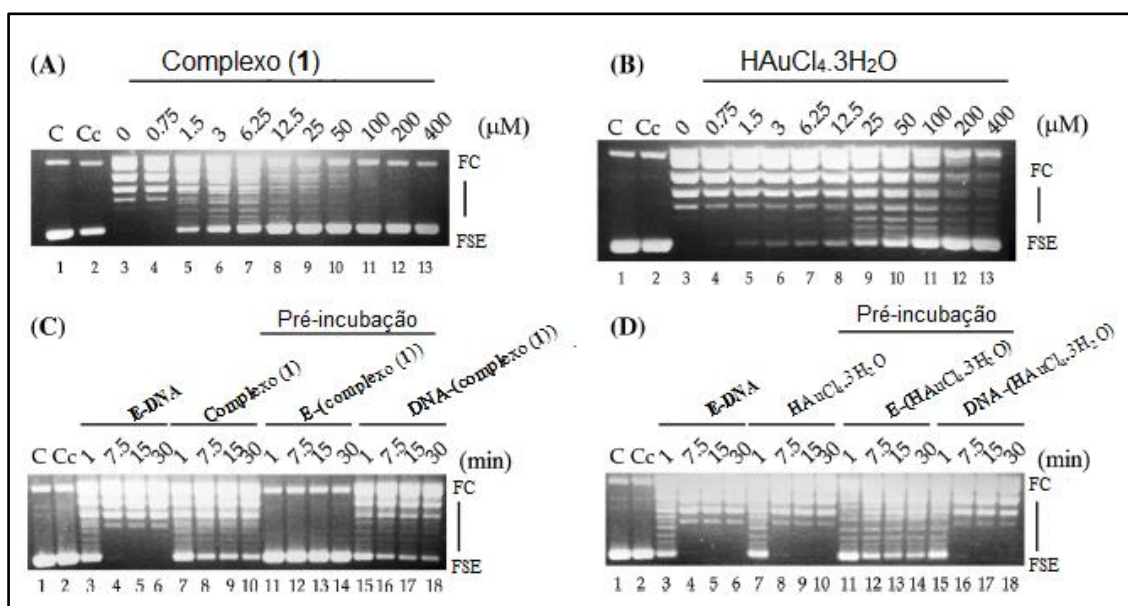


Figura 3.9: Relaxação do DNA super-enovelado pela topoisomerase IB na presença de concentrações crescentes (colunas 4-13) de complexo (1) (A) e H[AuCl₄.3H₂O] (B). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 400μM do complexo (1) ou H[AuCl₄.3H₂O]; Coluna 3: DNA plasmidial na presença da enzima. (C) Atividade da relaxação da Topo IB na presença de: E-DNA (colunas 3-6); 1,5μM complexo (1) (colunas 7-10); depois de 5 minutos de pré-incubação da enzima-complexo (1), antes da adição do substrato (colunas 11-14); depois de 5 minutos de pré-incubação DNA-complexo (1), antes da adição da enzima (colunas 15-18). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 1,5 μM complexo (1). (D) Atividade da relaxação da Topo IB na presença de: E-DNA (colunas 3-6); 1,5μM H[AuCl₄.3H₂O] (colunas 7-10); depois de 5 minutos de pré-incubação da enzima-H[AuCl₄.3H₂O], antes da adição do substrato (colunas 11-14); depois de 5 minutos de pré-incubação DNA-H[AuCl₄.3H₂O], antes da adição da enzima (colunas 15-18). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 1,5μM H[AuCl₄.3H₂O].

O complexo [Cu(L1)Cl] (4) reduz significativamente a atividade da Topo IB com inibição enzimática sendo verificada a partir de 0,75 μM e estando quase completa com a concentração do complexo igual a 3 μM (Figura 3.10 (B)). Por outro lado, nenhum efeito inibitório foi observado após a incubação da enzima com CuCl₂ até a concentração de 50 μM. Estes resultados indicam que o efeito observado para o complexo (4) não é devido à tiossemicarbazona livre ou ao íon metálico. É devido ao complexo em si.

Assim como verificado para o complexo (1), o efeito inibitório do complexo (4) é aumentado após pré-incubação do complexo com a enzima por cinco minutos antes da adição do DNA (Figura 3.10 (C)). A inibição completa da atividade enzimática é verificada para a concentração 0,75 μM e sugere que o complexo interage com a enzima sozinha.

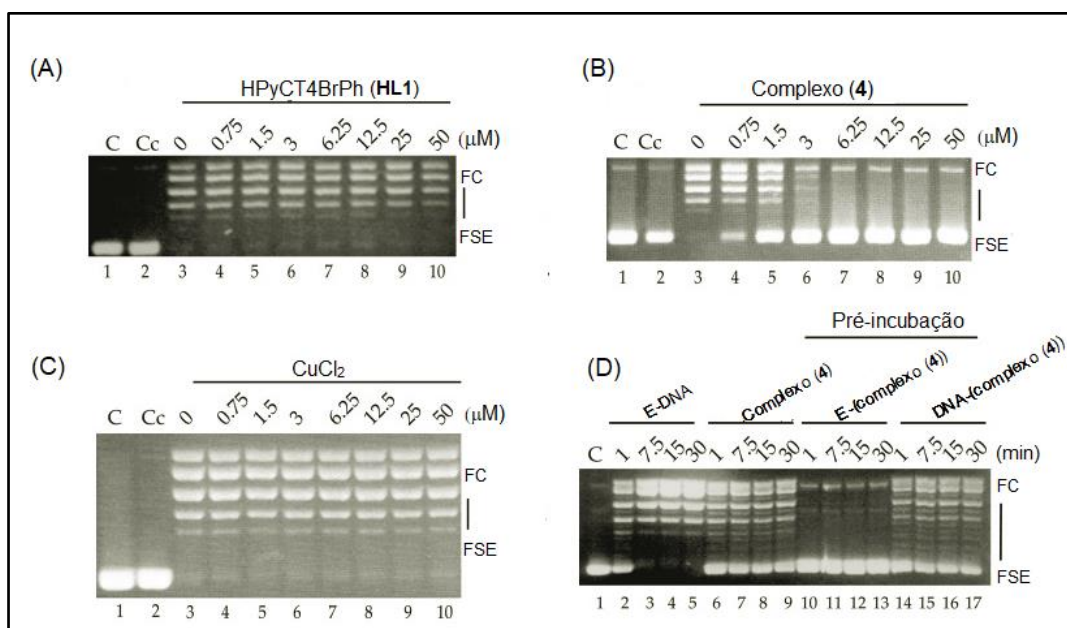


Figura 3.10: Relaxação do DNA plasmidial super-enovelado em concentrações crescentes de: (A) tiossemicarbazona livre. Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 50 μM de **HL1**; (B) complexo (4); (C) CuCl_2 . Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 50 μM do complexo (4) ou CuCl_2 ; Coluna 3: DNA plasmidial na presença da enzima; Coluna 4-10: E-DNA na presença de concentrações crescentes dos compostos. (D) Relaxação do DNA plasmidial super-enovelado em função do tempo na presença de: E-DNA (colunas 2-5); 0,75 μM do complexo (4) (colunas 6-9); 5 minutos da enzima-complexo pré-incubados antes da adição do DNA (colunas 10-13); 5 minutos do DNA-complexo pré-incubados antes da adição da enzima (colunas 14-17). Coluna 1: DNA plasmidial super-enovelado pBlueScript KSII(+); Coluna 2: DNA plasmidial na presença de 0,75 μM complexo (4).

A estrutura de dupla fita em forma de hélice do DNA armazena as informações genéticas de forma segura. Essa informação, contida nos nucleotídeos, fica “escondida” no interior da dupla fita. No entanto, alterações na topologia da estrutura do DNA ocorrem de forma natural nos processos como replicação e transcrição. Nesses processos ocorre a separação das fitas que formam a dupla hélice e a informação genética fica exposta. Essas alterações na topologia do DNA são controladas pela enzima topoisomerase, que possui a função de quebrar

temporariamente as fitas do DNA e depois religá-las. Na etapa em que a enzima cliva a fita do DNA ocorre a formação de um complexo DNA-topoisomerase denominado complexo de clivagem.

A capacidade do complexo (4) em inibir o processo catalítico da enzima nas etapas de quebra e religação da fita do DNA foi avaliada.

Na etapa de clivagem utilizou-se um substrato denominado “substrato suicida” (DNA) e a avaliação da capacidade do complexo (4) em inibir o processo de clivagem foi realizada por meio de eletroforese. Na ausência do complexo (4) cerca de 80% da reação de clivagem ocorre nos primeiros 15 segundos. Na presença de 12 μM do complexo (4) a reação de clivagem é fortemente inibida e a quantidade de substrato clivado é reduzido para 20% após uma hora de reação. (Figura 3.11)

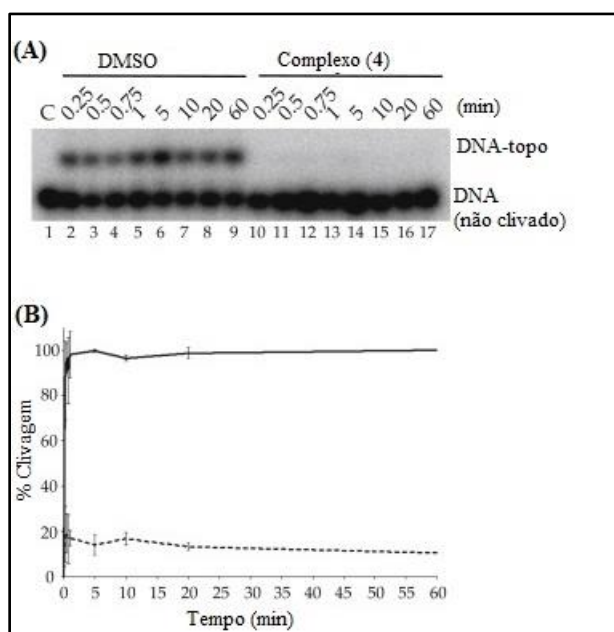


Figura 3.11: (A) Estudo de eletroforese em gel de ureia/poliacrilamida dos produtos de clivagem obtidos na ausência (colunas 2-9) e na presença de 12 μM do complexo (4) (colunas 10-17); coluna 1: substrato; (B) Porcentagem de clivagem em função do tempo na ausência (linha contínua) e na presença de 12 μM do complexo (4) (linha tracejada).

No processo de religação utilizou-se o mesmo substrato “suicida” adicionando um excesso da enzima e de um outro substrato complementar para que o ciclo catalítico fosse completado com a formação da dupla hélice como produto final. Por meio de eletroforese pode-se observar que na presença de 12 μM do complexo (4) a velocidade da reação é reduzida indicando que o composto inibe parcialmente o processo de religação. (Figura 3.12)

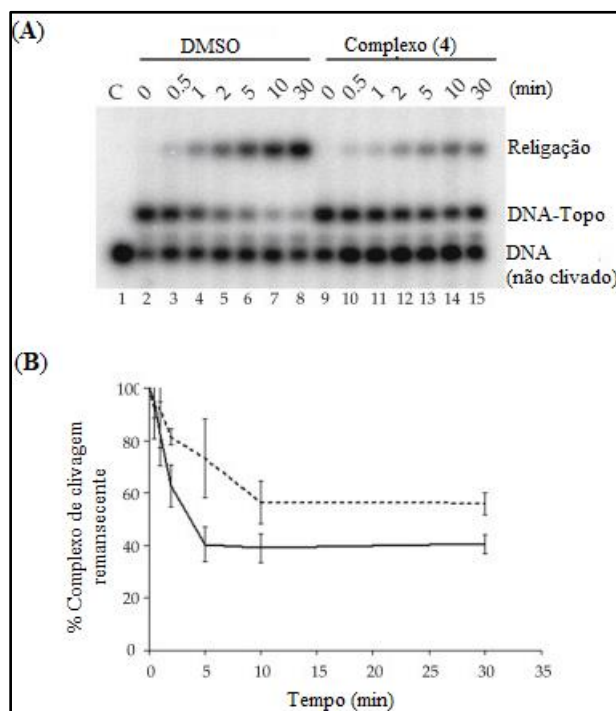


Figura 3.12: (A) Estudo de eletroforese em gel de ureia/poliacrilamida dos produtos da reação de religação realizado pela enzima topo IB na ausência (colunas 2-8) e na presença de 12 μ M do complexo (4) (colunas 9-15); coluna 1: substrato; (B) Porcentagem remanescente do complexo de clivagem em função do tempo na ausência (linha contínua) e na presença de 12 μ M do complexo (4) (linha tracejada).

Um dos fármacos conhecidos como inibidores da topoisomerase IB é a Camptotecina. Esse composto se liga ao complexo de clivagem estabilizando-o e assim inibindo a reação de religação devido ao rompimento da dupla-ligação.^{21,22} Um estudo por meio de eletroforese foi realizado a fim de se avaliar um possível mecanismo de ação para o complexo (4).

Após a incubação da enzima com o DNA observa-se um retardamento na mobilidade eletroforética em relação ao DNA puro devido à formação do complexo de clivagem DNA-topoisomerase (Figura 3.13; Colunas 1 e 3). Na presença de 12 μ M do complexo (4) não se observou a banda correspondente ao complexo de clivagem, sugerindo assim, que o complexo (4) não permite a interação entre a enzima e o DNA. Resultado que corrobora a ausência do processo de clivagem na presença do complexo metálico (Figura 3.13; Colunas 1 e 4). A incubação do complexo (4) com o DNA (Figura 3.13; Coluna 2), na ausência da enzima, mostra que não há variação na mobilidade eletroforética do DNA na presença do composto.

²¹ Y.H. Hsiang, L.F. Liu, Cancer Res. 48 (1988) 1722-1726.

²² Y.H. Hsiang, M.G. Lihou, L.F. Liu, Cancer Res. 49 (1989) 5077-5082.

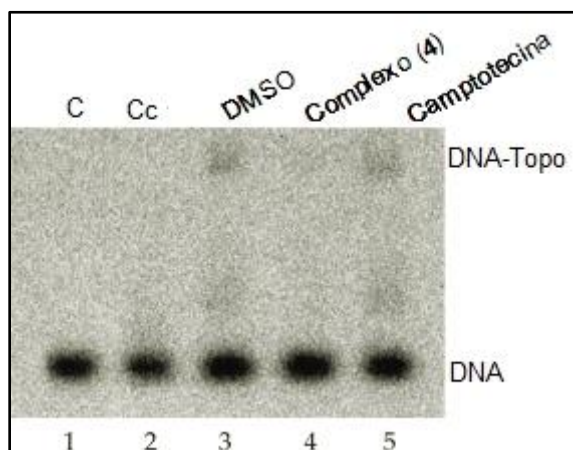


Figura 3.13: Estudo de eletroforese em gel de poliacrilamida de: Coluna 1: DNA; coluna 2: DNA na presença de 12 μM do complexo (4); coluna 3: DNA + enzima + DMSO; coluna 4: DNA + enzima + 12 μM do complexo (4); coluna 5: DNA + enzima + 50 μM camptotecina.

Na tentativa de corroborar os resultados de que o complexo (4) é um inibidor do ciclo catalítico da enzima Topoisomerase IB, experimentos de docagem molecular foram realizados. Um primeiro experimento foi realizado entre o complexo (4) e a proteína Topo IB isolada e um segundo experimento foi realizado entre o complexo (4) e o complexo de clivagem Topo-DNA.

No primeiro experimento, observou-se que o complexo (4) se espalha em várias regiões da estrutura da Topoisomerase IB provocando um impedimento estérico capaz de impedir a ligação do DNA à Topoisomerase (Figura 3.14). No segundo experimento de docagem realizado entre o complexo (4) e o complexo de clivagem Topo-DNA, observou-se que as interações em diferentes sítios da enzima provocam um impedimento estérico que é o responsável pela inibição das etapas de clivagem e religação das fitas. (Figura 3.15)

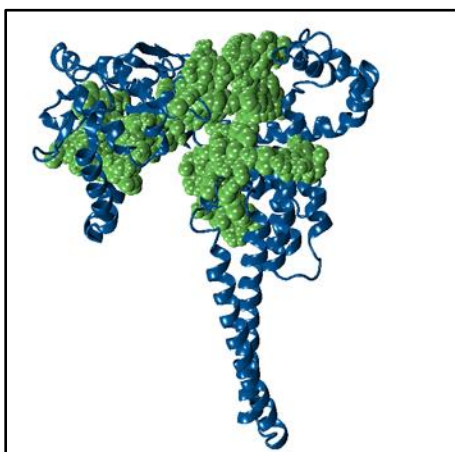


Figura 3.14: Previsões de acoplamento do modo de ligação

do complexo (4) e a proteína sozinha.

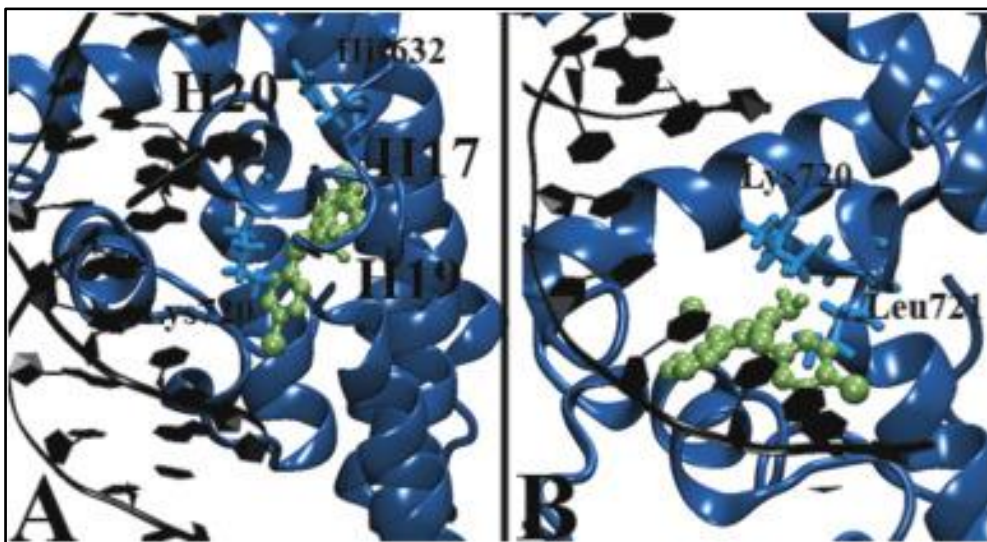


Figura 3.15: Previsões de acoplamento do modo de ligação do complexo (4) com: (A) complexo covalente; (B) complexo suicida.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda. Complexos de ouro(III) das tiossemicarbazonas

4.1 Hidrazonas derivadas de bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído

4.1.1. Análises

Foram obtidas três hidrazonas inéditas: 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído] fenilhidrazona (**HL2**), 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído]-*para*-clorofenil-hidrazona (**HL3**) e 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído]-metil-hidrazona (**HL4**). A curva TG para o composto **HL4** mostra uma perda de massa de 2,72 % entre 35 a 150 °C referente à presença de meia molécula de água de hidratação (valor teórico corresponde a 2,89 %).

Na Tabela 4.1 estão apresentados o rendimento experimental, cor, temperatura de fusão, análise elementar* e massa molar dos compostos.

Tabela 4.1: Dados de caracterização das hidrazonas **HL2**, **HL3** e **HL4**.

Composto	Rend. (%)	Cor	Temp. de fusão (°C)	%C*	%H*	%N*	MM (g.mol ⁻¹)
HL2	75	Amarelo	83,5-84,2	59,66 (59,35)	5,85 (5,26)	11,73 (11,54)	364,26
HL3	90	Bege	205,0-206,0	54,17 (54,22)	3,99 (4,55)	10,78 (10,54)	398,71
[HL4].0,5H ₂ O	75	Amarelo	94,0-95,0	49,81 (50,17)	5,34 (5,83)	13,98 (13,50)	311,21

*Os valores teóricos estão entre parênteses;

A figura 4.1 mostra as propostas estruturais para **HL2**, **HL3** e **HL4** com base nos espectros de RMN, IV e curvas TG.

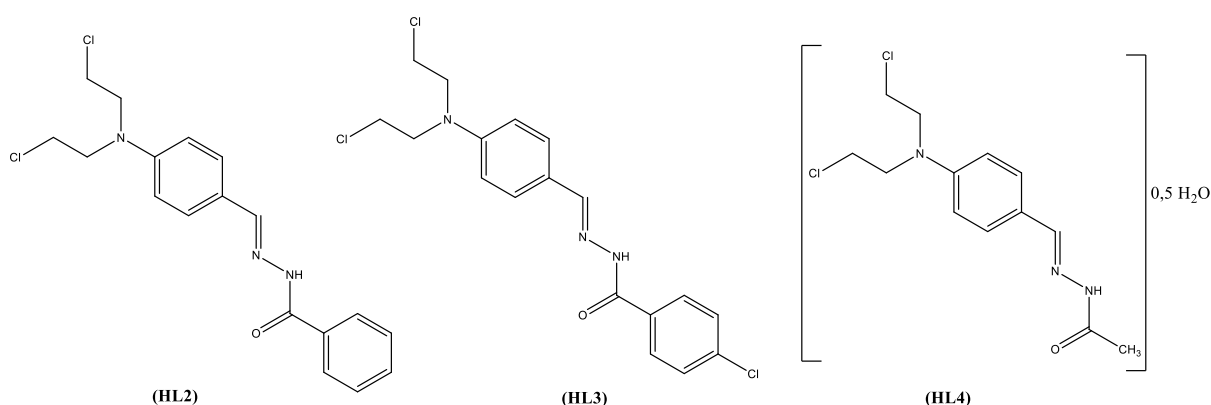


Figura 4.1: Estruturas propostas para as hidrazonas **HL2**, **HL3** e **HL4**.

Em razão da baixa afinidade de ouro(III) por ligantes contendo oxigênio como átomos doadores, não foi possível obter complexos de ouro das hidrazonas aqui estudadas.

4.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC e NOESY. Todos os espectros foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$ no aparelho de frequência 400 MHz.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos ligantes **HL2** e **HL3**, observou-se apenas um sinal para cada hidrogênio e carbono, o que sugere a presença apenas da configuração do isômero *E* em solução. Os sinais em δ 11,57 (**HL2**) e δ 11,63 (**HL3**) foram atribuídos a N(3)-H. O sinal em δ 7,58-7,56 atribuído ao H12 em **HL2**, está ausente em **HL3** e **HL4**. O ligante **HL4** apresenta um sinal em δ 2,15 atribuído aos três hidrogênios do grupo metil. Os sinais atribuídos a C7=N e C8=O para os ligantes **HL2** e **HL3** foram, respectivamente, δ 148,2; δ 148,6 e δ 162,7; δ 161,6.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **HL4** os sinais dos hidrogênios e carbonos estão duplicados, indicando a existência de isômeros, nas configurações *E* e *Z* em solução¹ (Figura 4.2) encontrando-se o isômero *E* em maior proporção (60%). Dois sinais de N(3)-H foram observados, em δ 11,08 e δ 10,96, atribuídos aos isômeros *Z* e *E* respectivamente. De maneira similar, os sinais de C8=O em δ 171,4 e δ 165,3 são atribuídos aos isômeros *Z* e *E*. Esses dados estão apresentados nas tabelas 4.2 e 4.3.

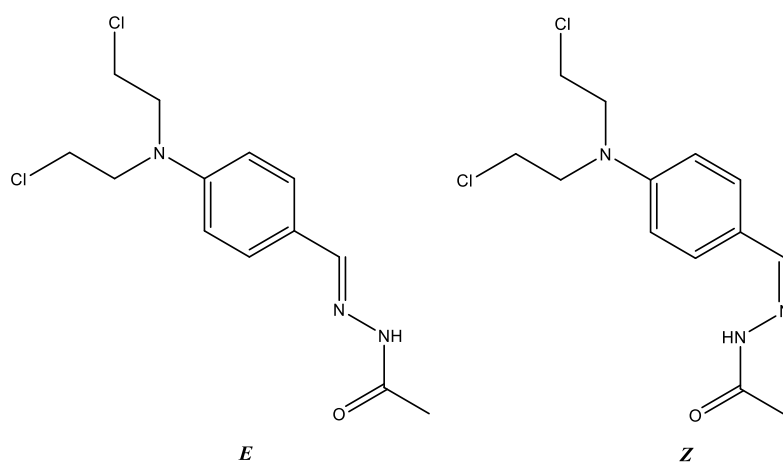


Figura 4.2: Isômeros configuracionais *E* e *Z* de **HL4**.

A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das hidrazonas é apresentada na Figura 4.3.

¹ 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) 698-706.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

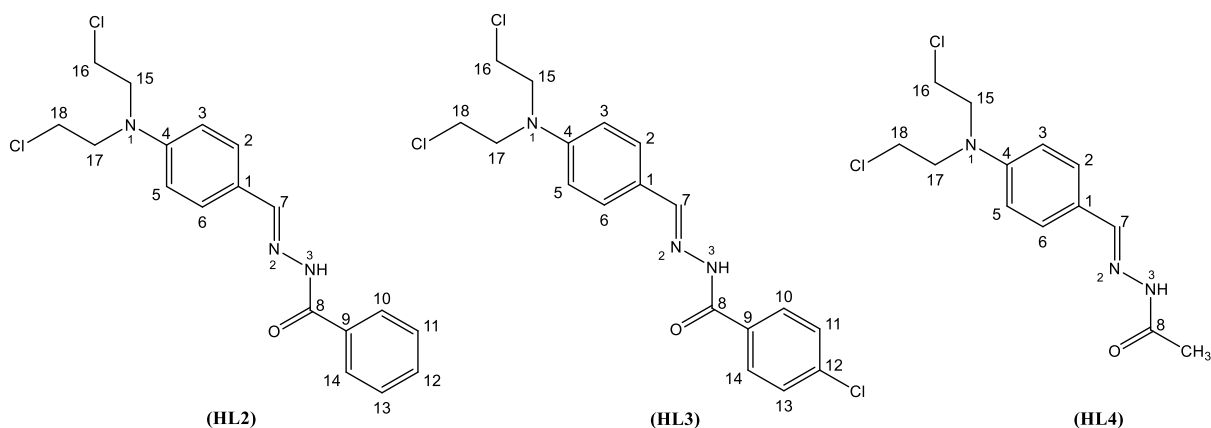


Figura 4.3: Estruturas das hidrazonas e numeração adotada para as atribuições dos átomos constituintes.

Tabela 4.2: Atribuições (A), número de hidrogênio (N°), multiplicidade*, deslocamentos químicos (ppm) e constante de acoplamentos (J/Hz) dos principais sinais de RMN de ^1H dos ligantes **HL2**, **HL3** e **HL4** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

A	N°	δ				
		HL2	HL3	Z	HL4	E
H2, H6	2	7,51 (t, $J=8,7$)	7,58(t, $J=8,1$)	-	7,49(t, $J=7,8$)	
H3, H5	2	6,81 (d, $J=16,4$)	6,84 (d, $J=8,6$)	-	6,81-6,78(m)	
H7	1	8,34(s)	8,32(s)	8,01(s)	7,85(s)	
H10, H14	2	7,90 (d, $J=7,3$)	7,93 (d, $J=8,4$)	-	-	
H11, H13	2	7,58-7,56 (m)	7,58 (t, $J=8,1$)	-	-	
H12	1	7,58-7,56 (m)	-	-	-	
H15, H17	4	3,81-3,75 (m)	3,78 (t, $J=5,6$)	-	3,76(s)	
H16, H18	4	3,81-3,75 (m)	3,78 (t, $J=5,6$)	-	3,76(s)	
N(3)H	1	11,57 (s)	11,63 (s)	11,08 (s)	10,96(s)	
H9	3	-	-	-	2,15(s)	

*Multiplicidade: s=singleteo; d=dupleteo; t=tripleteo; m=multiplero;

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.3: Atribuição e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT-135 dos ligantes **HL2**, **HL3** e **HL4** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

A	DEPT	δ					
		HL2		HL3		HL4	
			DEPT		DEPT	Z	E
C1	--	122,7	--	122,6	--	-	122,8
C2, C6	↑	128,7	↑	128,8	↑	128,6	128,2
C3, C5	↑	111,8	↑	111,9	↑	-	111,8
C4	--	148,0	--	148,1	--	-	145,9
C(7)=N	↑	148,2	↑	148,6	↑	146,1	142,9
C(8)=O	--	162,7	--	161,6	--	171,4	165,3
C9	--	133,7	--	132,4	↑	21,6	20,4
C10, C14	↑	127,4	↑	129,4	-	-	-
C11, C13	↑	131,4	↑	128,4	-	-	-
C12	↑	128,3	--	136,2	-	-	-
C15, C17	↓	51,9	↓	51,8	↓	-	51,9
C16, C18	↓	41,0	↓	41,0	↓	-	41,7

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante **HL2** estão representados nas Figuras 4.4 e 4.5 respectivamente.

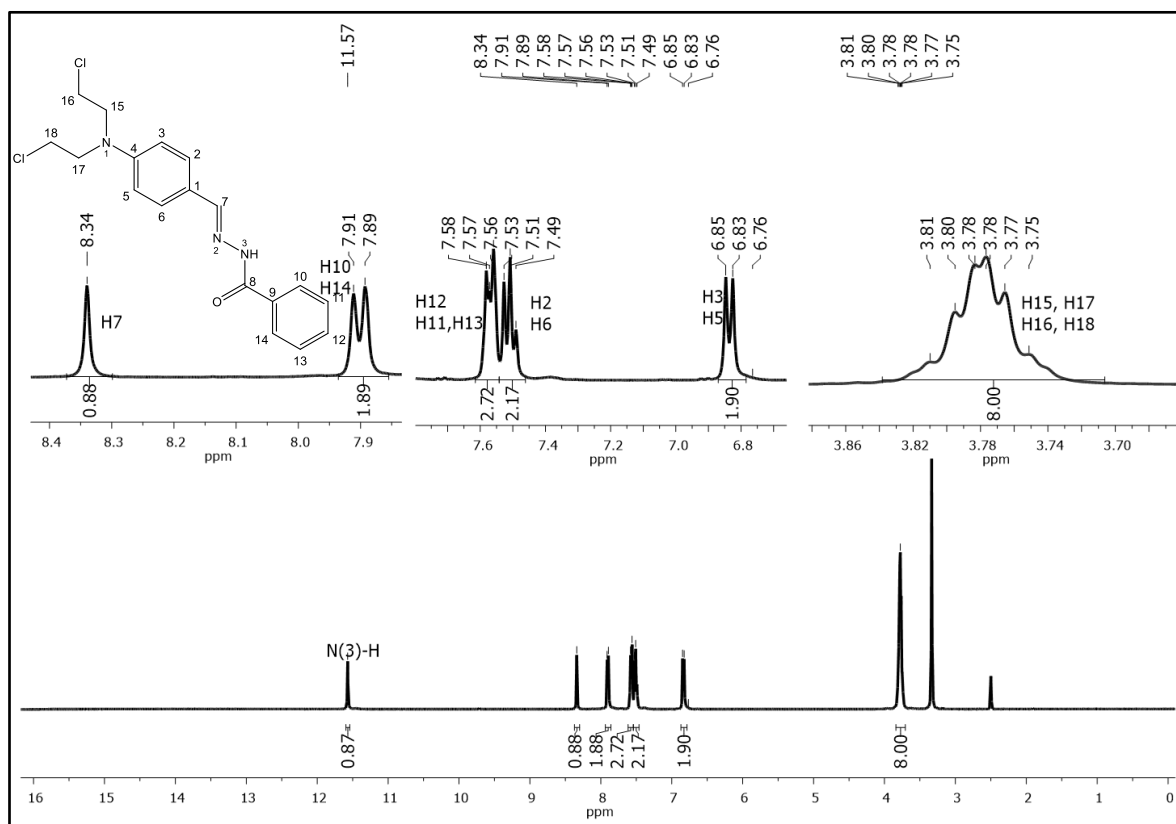


Figura 4.4: Espectro de RMN de ^1H (a 400MHz) da hidrazona **HL2** obtido em DMSO- d_6 .

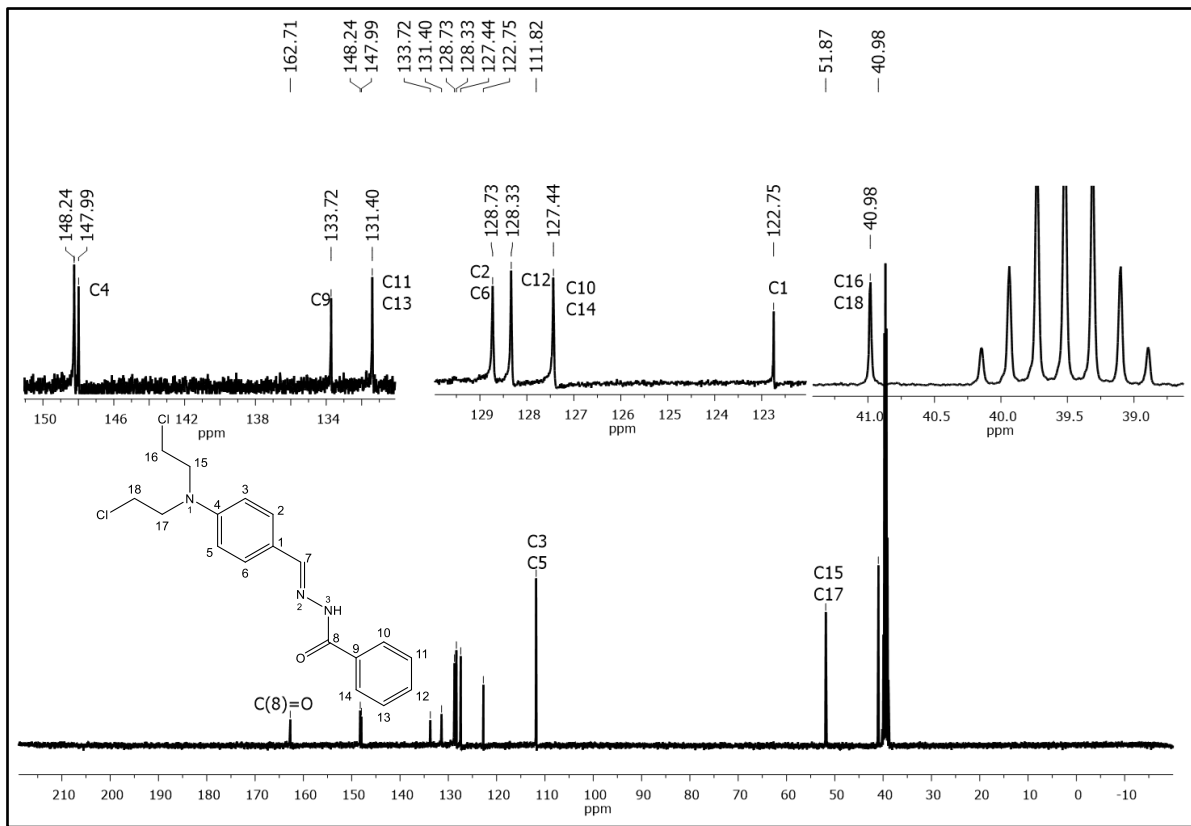


Figura 4.5: Espectros de RMN de ^{13}C (a 100 MHz) da hidrazona **HL2** obtido em $\text{DMSO-}d_6$.

A esteoquímica *E* do ligante hidrazona foi determinada com o auxílio do mapa de contorno NOESY, por meio do acoplamento de N(3)-H com H7 (Figura 4.6).

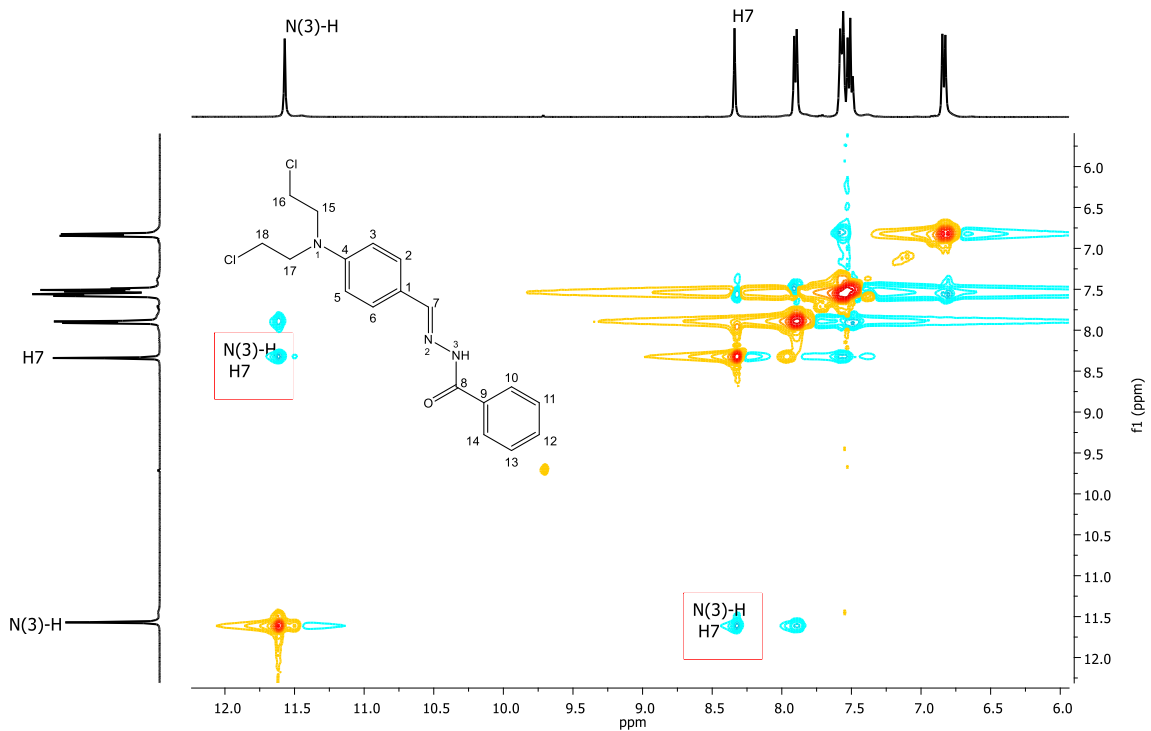


Figura 4.6: Espectro de RMN NOESY da hidrazona **HL2** obtido em $\text{DMSO-}d_6$.

4.1.1.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Na tabela 4.4 estão apresentados os números de onda máximos das bandas mais importantes observadas nos espectros vibracionais das hidrazonas, na região de 4000-400 cm^{-1} .

A banda atribuída ao estiramento da ligação C=O foi observada em 1636, 1638 e 1656 cm^{-1} nos ligantes **HL2**, **HL3** e **HL4** respectivamente. As bandas em 1612-1595 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento da ligação C=N. O estiramento N-H foi observado em 3217, 3180 e 3080 cm^{-1} nas hidrazonas **HL2**, **HL3** e **HL4** respectivamente. Uma absorção larga em 3460 cm^{-1} no espectro de **HL4** foi atribuída à vibração $\nu(\text{O-H})$. Na Figura 4.7 estão representados os espectros de infravermelho para as hidrazonas **HL2**, **HL3** e **HL4**.

Tabela 4.4: Atribuições das principais bandas (ν/cm^{-1}) de absorção na região do infravermelho das hidrazonas **HL2**, **HL3** e **HL4**.

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$
HL2	-	3217	1636	1604-1595
HL3	-	3180	1638	1612-1600
HL4	3460	3080	1656	1610

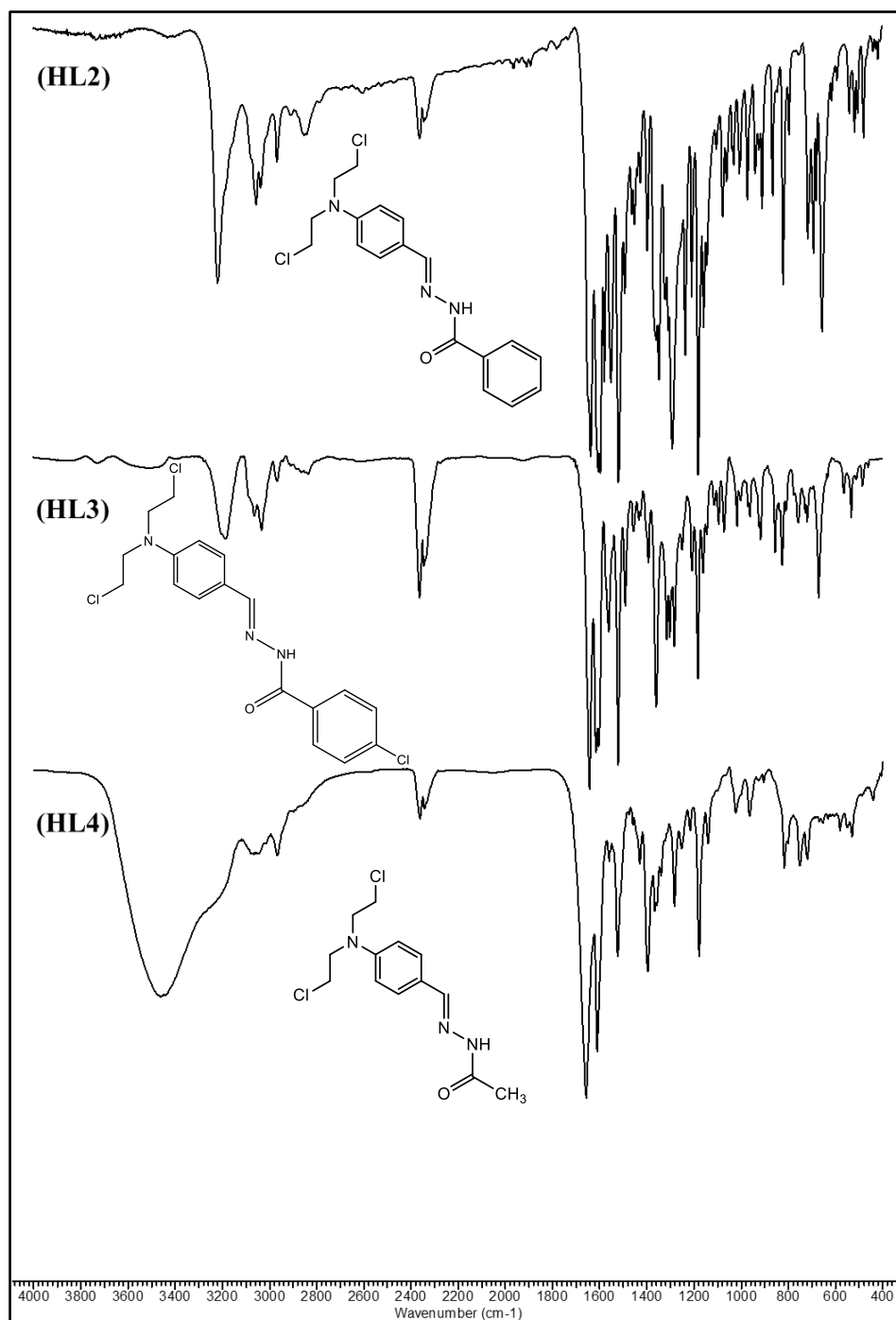


Figura 4.7: Espectros de absorção na região do infravermelho das hidrazonas **HL2**, **HL3** e **HL4** obtidos em pastilhas de KBr.

4.1.1.4. Cristalografia de Raios X

Foi obtido monocristal do ligante **HL2** adequado para a difração de raios X, após a recristalização do composto à temperatura ambiente em DMSO-*d*₆. A estrutura cristalográfica de **HL2** foi obtida em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI (LabCri) com fonte de grafite MoK α ($\lambda =$

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

0,71073 Å). Os dados foram coletados a temperatura ambiente (293 K) utilizando o programa CrysAlisPro.² Foi aplicada a correção de absorção baseada no método de varredura múltipla. Usando Olex2.³ A estrutura foi resolvida com o programa de solução de estrutura XT15.⁴ O procedimento de refinamento de mínimos quadrados de matriz completa em F^2 com parâmetros térmicos anisotrópicos foi realizado usando o pacote de refinamento XL16.⁵ Os parâmetros de deslocamento atômico posicionais e anisotrópicos foram refinados para todos os átomos não hidrogenados. Os átomos de hidrogênio foram colocados geometricamente e os parâmetros posicionais foram refinados usando um modelo de equitação.

Na Tabela 4.5 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina. Na figura 4.8 está representado o diagrama ORTEP. Os principais valores de comprimentos e ângulos de ligação estão apresentados nas Tabelas 4.6 e 4.7 respectivamente.

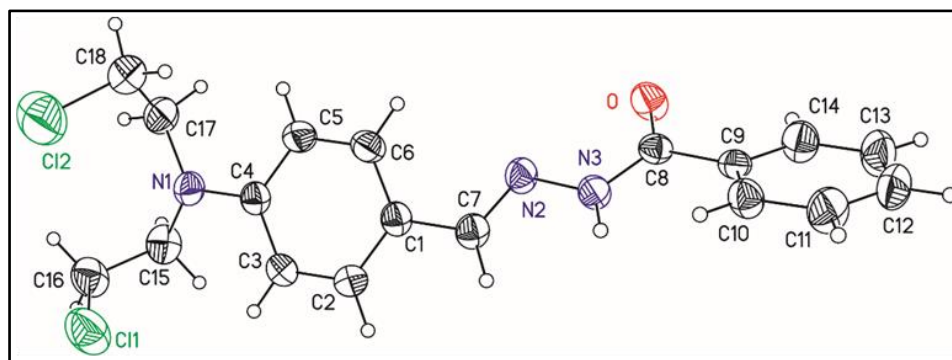


Figura 4.8: Diagrama ORTEP para a hidrazona (HL2).

As distâncias e os ângulos de ligação são bem similares aos encontrados na literatura para hidrazonas com estruturas semelhantes.⁶ A distância da ligação C8=O foi 1,225(2) e a distância da ligação C7=N2 foi 1,274(3), conforme esperado para ligações duplas. A ligação N2-N3 apresentou uma distância de 1,393(2) em concordância com o caráter de ligação simples dessa ligação. De acordo com os dados obtidos, a proposta de estrutura do ligante foi confirmada.

² 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.

³ Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J, Howard, J.A.K. & Puschmann, H. (2009), *J. Appl. Cryst.* 42, 339-341

⁴ Sheldrick, G.M. (2015). *Acta Cryst.* A71, 3-8.

⁵ Sheldrick, G.M. (2008). *Acta Cryst.* A64, 112-122.

⁶ 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) 163-172.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.5: Resumo da coleção de dados cristalográficos e os resultados dos refinamentos da estrutura cristalográfica do ligante (**HL2**).

Dados	HL2
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O
Massa molecular (g mol ⁻¹)	364,26
Temperatura (K)	293(2)
Sistema cristalino, grupo espacial	ortorrômbico, Pca21
Tamanho do cristal	0.3 x 0.27 x 0.25
Parâmetros da célula unitária	
a (Å)	9.8199(3)
b (Å)	19.3212(7)
c (Å)	9.4660(3)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
V (Å ³)/ Z	1796.01(11)/4
Densidade calculada (mg m ⁻³)	1,347
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,371
F(000)	760
Intervalo de θ (°)	2.11-29.41
Faixa de índices de Miller	-13 < h < 12 -25 < k < 26 -13 < l < 13
Reflexões coletadas	20532
Reflexões únicas (R _{int})	4550 (0.0308)
Dados/restrições/parâmetros	4550 / 1 / 217
S	1.054
Índices de R final [I>2σ(I)]	R1 = 0.0433, wR2 = 0.1073
Índices de R (todos os dados)	R1 = 0.0537, wR2 = 0.1145
Δρ _{máx} e Δρ _{mín} (e Å ⁻³)	0.407 e -0.473

Tabela 4.6: Principais comprimentos (Å) de ligação da hidrazona (**HL2**). Desvio padrão entre parênteses.

Ligação	HL2
C1-C7	1.456(3)
N2-C7	1.274(3)
N2-N3	1.393(2)
N3-C8	1.345(3)
C8-O	1.225(2)

Tabela 4.7: Principais ângulos (°) de ligação da hidrazona (**HL2**). Desvio padrão entre parênteses.

Ângulo	HL2
N3-C8-O	122.78(18)
C7-N2-N3	115.85(16)
N3-C8-C9	116.26(17)
C8-N3-N2	118.21(16)
C1-C7-N2	120.39(18)

4.2 Tiossemicarbazonas derivadas de bis[(2-cloroetil)amino]benzaldeído e seus complexos de ouro(III)

4.2.1 Análises

Foram sintetizadas três tiossemicarbazonas, entre as quais duas já foram descritas na literatura: 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-feniltiossemicarbazona (**HL5**)⁷, 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-*para*-clorofenil-tiossemicarbazona (**HL6**) e 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzaldeído-N(4)-metil-tiossemicarbazona (**HL7**)⁸ e seus respectivos complexos (inéditos) de ouro (III) (**5**), (**6**) e (**7**).

Os valores obtidos para as microanálises e condutividades molares indicam a obtenção de complexos de ouro(III) do tipo $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{HCl}$, onde L é o ligante tiossemicarbazona na sua forma aniônica. Os compostos (**5**), (**6**) e (**7**) apresentam dois cloretos coordenados ao metal, em concordância com a obtenção de compostos de ouro(III). Na curva TG para o complexo (**5**) observa-se uma perda de massa de 9,72 % em torno de 200 °C, que confirma a presença de duas moléculas de HCl (valor teórico: 9,92 %). A curva TG para o complexo (**6**) mostra uma perda de massa de 4,26 % entre 35,0 e 170,0 °C referente à presença de duas moléculas de água de hidratação (valor teórico corresponde a 4,92%) e uma perda de 8,83 % em torno de 200 °C, de acordo com a presença de duas moléculas de HCl (valor teórico: 9,05 %). O composto (**7**) apresenta uma molécula de água de hidratação, o que pode ser confirmado pela TG, onde se observou uma perda de massa de 2,57 % entre 35,0 e 170,0 °C (valor teórico corresponde 2,61 %) e uma perda de massa de 10,50 % referente a duas moléculas de HCl (valor teórico: 10,55 %) próximo a 200°C. Assim, os dados das curvas TG confirmam as moléculas de solvente propostas pelos dados de análise elementar.

A análise condutimétrica ($\text{DMF } 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) indica que os complexos apresentaram condutividade molar de $32,26 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, $23,41 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ e $15,56 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ respectivamente, compatível com a presença de um composto neutro⁹. No entanto, o valor relativamente alto das condutividades sugere possível dissociação de HCl em solução. Dessa forma, propõe-se a formação dos compostos $[\text{Au}(\text{L5})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{HCl}$ (**5**), $[\text{Au}(\text{L6})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) e $[\text{Au}(\text{L7})\text{Cl}_2] \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**7**).

Na Tabela 4.8 estão apresentados o rendimento experimental, cor, temperatura de fusão, análise elementar*, massa molar e condutimetria dos compostos.

⁷ Sankaraperumal, A.; Karthikeyan, J.; Shetty, A.N.; J. Struct. Chem. 53 (2012) 932-937.

⁸ Sankaraperumal, A.; Karthikeyan, J.; Shetty, A.N.; Lakshmisundaram, R.; Polyhedron 50 (2013) 264-269.

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

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.8: Dados de caracterização das tiossemicarbazonas (**HL5**), (**HL6**) e (**HL7**) e seus complexos de ouro(III) (**5**), (**6**) e (**7**).

Composto	Rend. (%)	Cor	Temp. fusão ^a (°C)	%C*	%H*	%N*	MM (g.mol ⁻¹)	ΔM ^b
HL5	97	Amarelo	173,5-174,0	54,95 (54,69)	5,13 (5,10)	14,37 (14,17)	395,35	-
(5)	50	Preto	Dec. > 169,0	29,41 (29,49)	2,75 (2,88)	7,20 (7,62)	735,13	32,26
HL6	70	Amarelo	171,0-172,2	50,36 (50,30)	4,14 (4,46)	13,28 (13,04)	429,79	-
(6)	68	Verde escuro	Dec. > 162,0	26,64 (26,84)	2,24 (3,00)	6,51 (6,95)	805,59	23,41
HL7	70	Amarelo	140,4-142,9	47,41 (46,85)	5,07 (5,44)	16,90 (16,81)	333,28	-
(7)	50	Verde escuro	Dec. > 156,0	21,95 (22,59)	2,28 (3,06)	7,47 (8,11)	691,06	15,56

*Os valores teóricos estão entre parênteses; ^a Decomposição: dec.; ^b cm² Ω⁻¹ mol⁻¹

A Figura 4.9 mostra as propostas estruturais para os ligantes **HL5**, **HL6** e **HL7** e seus respectivos complexos de ouro(III) (**5**), (**6**) e (**7**).

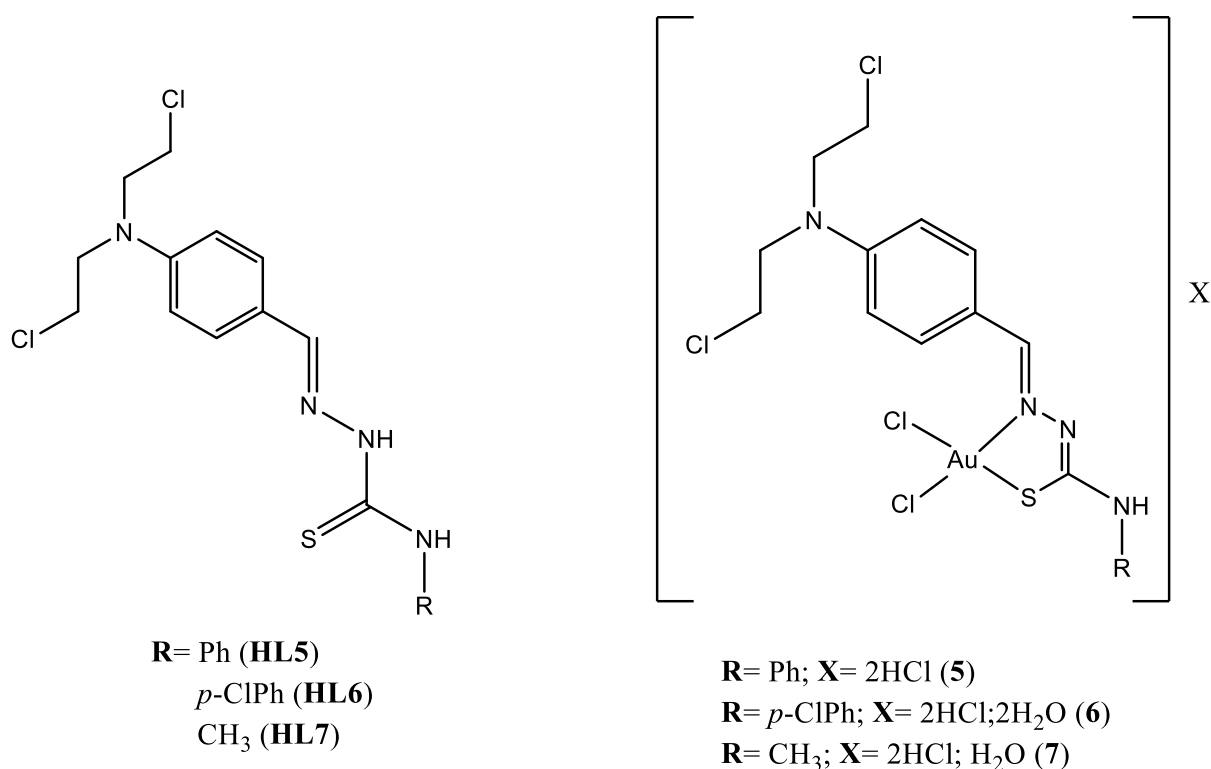


Figura 4.9: Estruturas propostas para os ligantes **HL5**, **HL6** e **HL7** e para os complexos de ouro(III) (**5**), (**6**) e (**7**).

4.2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear

Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC e NOESY. Todos os espectros foram obtidos em DMF- d_7 no aparelho de frequência 400 MHz.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos ligantes **HL5**, **HL6** e **HL7** e complexos **(5)**, **(6)** e **(7)** observou-se um sinal para cada hidrogênio e carbono, o que sugere a presença apenas da configuração do isômero *E* em solução. A estereoquímica *E* dos ligantes foi determinada com o auxílio do mapa de contorno NOESY, por meio do acoplamento de N(3)-H com H7. Os sinais em δ 11,51, δ 11,60 e δ 11,11 foram atribuídos a N(3)-H em **HL5**, **HL6** e **HL7** respectivamente. Nos espectros de ^1H dos complexos, verifica-se o desaparecimento do sinal referente a N(3)-H, indicando que a tiossemicarbazona encontra-se coordenada ao metal na sua forma desprotonada.

Os sinais de todos os hidrogênios e carbonos sofreram significativos deslocamentos após a coordenação. O ligante **HL7** apresenta um sinal em δ 3,15 atribuído aos três hidrogênios do grupo metil. Esse sinal deslocou-se para δ 3,22 após a complexação com o ouro.

Observa-se nos complexos, um deslocamento significativo dos sinais referentes a C7=N e C8=S, em concordância com a coordenação ao enxofre e ao nitrogênio imínico. Nos ligantes **HL5**, **HL6** e **HL7**, os sinais referentes a esses carbonos aparecem em 143,9 (C7) e 176,2 (C8) ppm, 144,2 (C7) e 176,2 (C8) ppm, 142,7 (C7) e 178,5 (C8) ppm respectivamente. Nos complexos **(5)**, **(6)** e **(7)**, esses sinais são observados 155,5 (C7) e 165,6 (C8) ppm, 156,1 (C7) e 165,3 (C8) ppm, 148,7 (C7) e 163,3 (C8) ppm respectivamente.

Esses dados estão apresentados na tabela 4.9 e 4.10. A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das tiossemicarbazonas está apresentada na Figura 4.10.

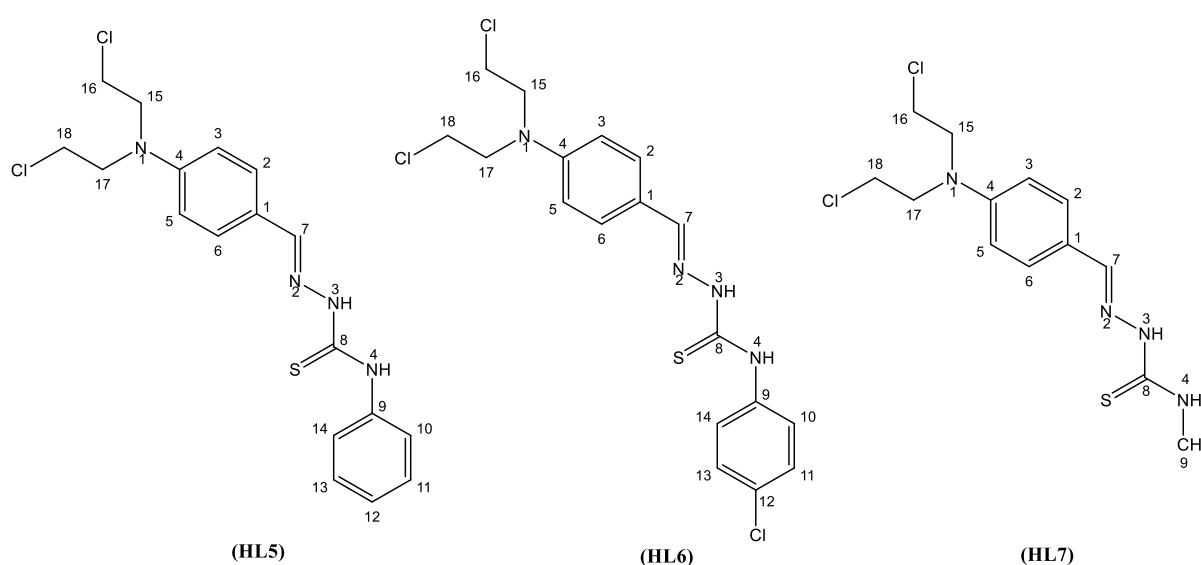


Figura 4.10: Estruturas das tiossemicarbazonas e numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.9: Atribuições (A), número de hidrogênio (N°), multiplicidade^a, deslocamentos químicos (ppm) e constante de acoplamentos (J/Hz) dos principais sinais de RMN de ¹H dos ligantes (**HL5**), (**HL6**) e (**HL7**) e seus respectivos complexos (**5**), (**6**) e (**7**). (DMF-*d*₇, 400 MHz)

		δ					
A	N°	HL5	(5)	HL6	(6)	HL7	(7)
H2, H6	2	6,91 (d, J=8,9)	7,02 (d, J= 9,1)	6,91 (d, J=8,9)	7,08 (d, J=9,1)	6,88 (d, J=8,9)	6,91 (d, J=8,6)
H3, H5	2	7,80 (t, J= 8,5)	8,19 (d, J= 9,0)	7,85 (d, J=8,8)	8,18 (d, J=9,1)	7,69 (d, J=8,8)	7,73 (d, J=8,5)
H7	1	8,26 (s)	8,68 (s)	8,26 (s)	8,72 (s)	8,13 (s)	8,40 (s)
H10, H14	2	7,80 (t, J= 8,5)	7,62 (d, J=7,9)	7,78 (d, J=8,8)	7,66 (d, J=8,8)	-	-
H11, H13	2	7,38 (t, J=7,8)	7,50 (t, J=7,8)	7,43 (d, J=8,8)	7,55 (d, J=8,8)	-	-
H12	1	7,19 (t, J=7,4)	7,21 (t, J=7,3)	-	-	-	-
H15, H17	4	3,87 (t, J=12,2)	4,04 (t, J= 6,6)	3,91 (d, J=5,7)	4,06 (t, J=6,6)	3,89 (d, J=5,6)	3,91 (d, J=6,0)
H16, H18	4	3,87 (t, J=12,2)	3,92 (t, J= 6,5)	3,85 (t, J=6,2)	3,97-3,90 (m)	3,85 (d, J=5,7)	3,86 (d, J=6,0)
N(3)-H	1	11,51 (s)	-	11,60 (s)	-	11,11 (s)	-
N(4)-H	1	10,09 (s)	10,47(s)	10,19 (s)	10,55 (s)	8,53 (s)	9,09 (s)
H9	3	-	-	-	-	3,15 (d, J=4,6)	3,22 (d, J=4,5)

^a multiplicidade: s=simpleto; d=dupleto; t=tripleto; m=multiplero

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.10: Atribuição e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e DEPT-135 dos ligantes (**HL5**), (**HL6**) e (**HL7**) e seus respectivos complexos (**5**), (**6**) e (**7**). (DMF- d_7 , 100 MHz)

δ												
Atribuição	DEPT	HL5	DEPT	5	DEPT	HL6	DEPT	6	DEPT	HL7	DEPT	7
C1	--	123,3	--	118,4	--	123,2	--	118,2	--	123,5	--	123,6
C2, C6	↑	112,2	↑	113,3	↑	112,2	↑	113,4	↑	112,1	↑	113,0
C3, C5	↑	125,1	↑	138,0	↑	129,6	↑	137,9	↑	129,1	↑	130,5
C4	--	148,7	--	153,2	--	148,8	--	153,4	--	148,3	--	149,8
C(7)=N	↑	143,9	↑	155,5	↑	144,2	↑	156,1	↑	142,7	↑	148,7
C(8)=S	--	176,2	--	165,6	--	176,2	--	165,3	--	178,5	--	163,3
C9	--	140,0	--	141,9	--	129,5	--	129,9	↑	30,7	↑	32,04
C10, C14	↑	129,6	↑	122,3	↑	126,8	↑	123,6	-	-	-	-
C11, C13	↑	128,3	↑	130,2	↑	128,2	↑	130,2	-	-	-	-
C12	↑	125,1	--	125,7	--	139,0	--	140,8	-	-	-	-
C15, C17	↓	52,7	↓	53,3	↓	52,7	↓	53,2	↓	52,6	↓	53,4
C16, C18	↓	41,3	↓	42,0	↓	41,3	↓	42,0	↓	41,3	↓	42,1

Nas Figuras 4.11 e 4.12 estão representados os espectros de ^1H e de ^{13}C do ligante **HL5** e seu complexo (**5**).

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

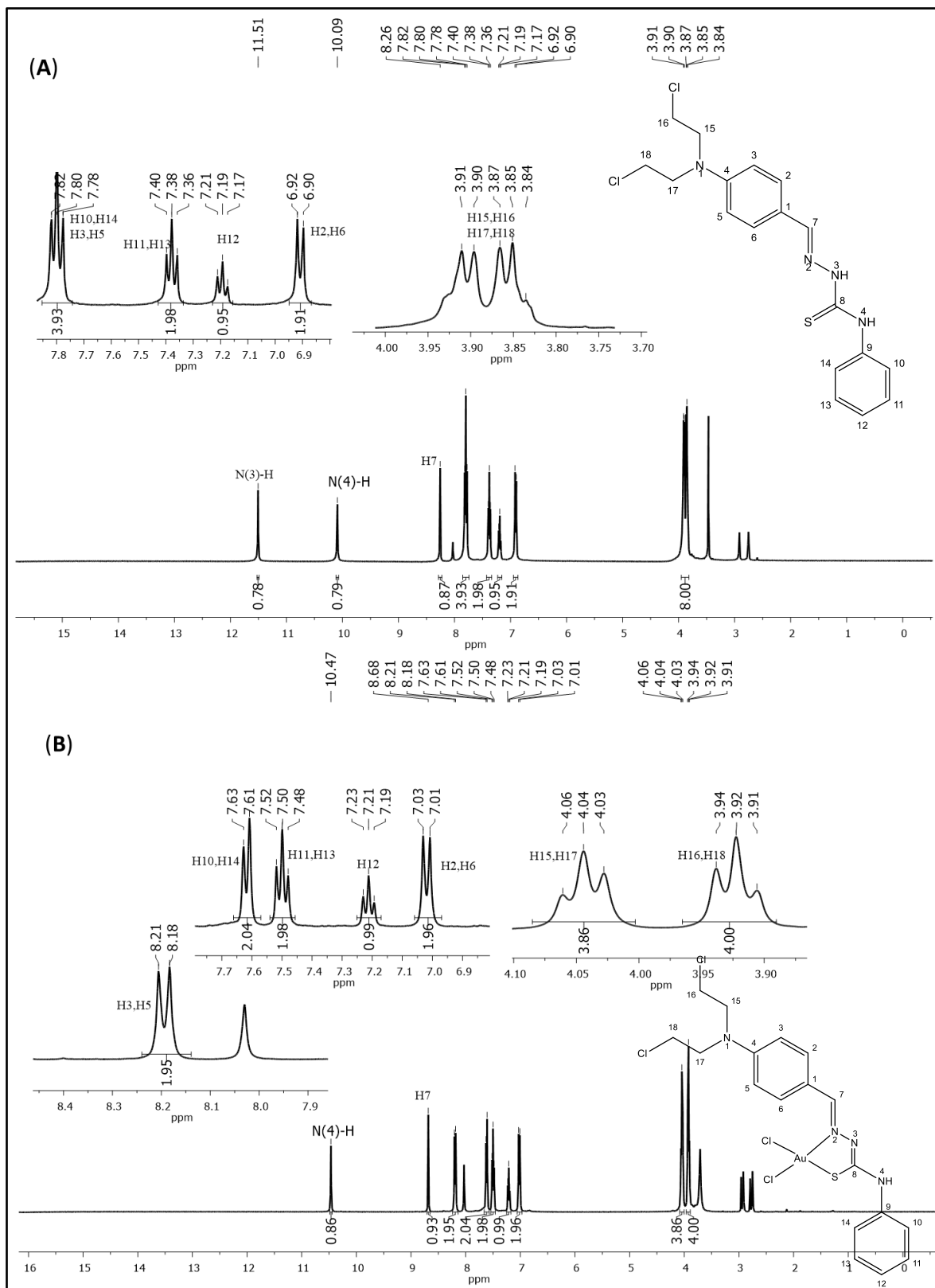


Figura 4.11: Espectros de RMN de ¹H (a 400MHz): (A) ligante HL5 e (B) complexo (5), obtidos em DMF-d₇.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

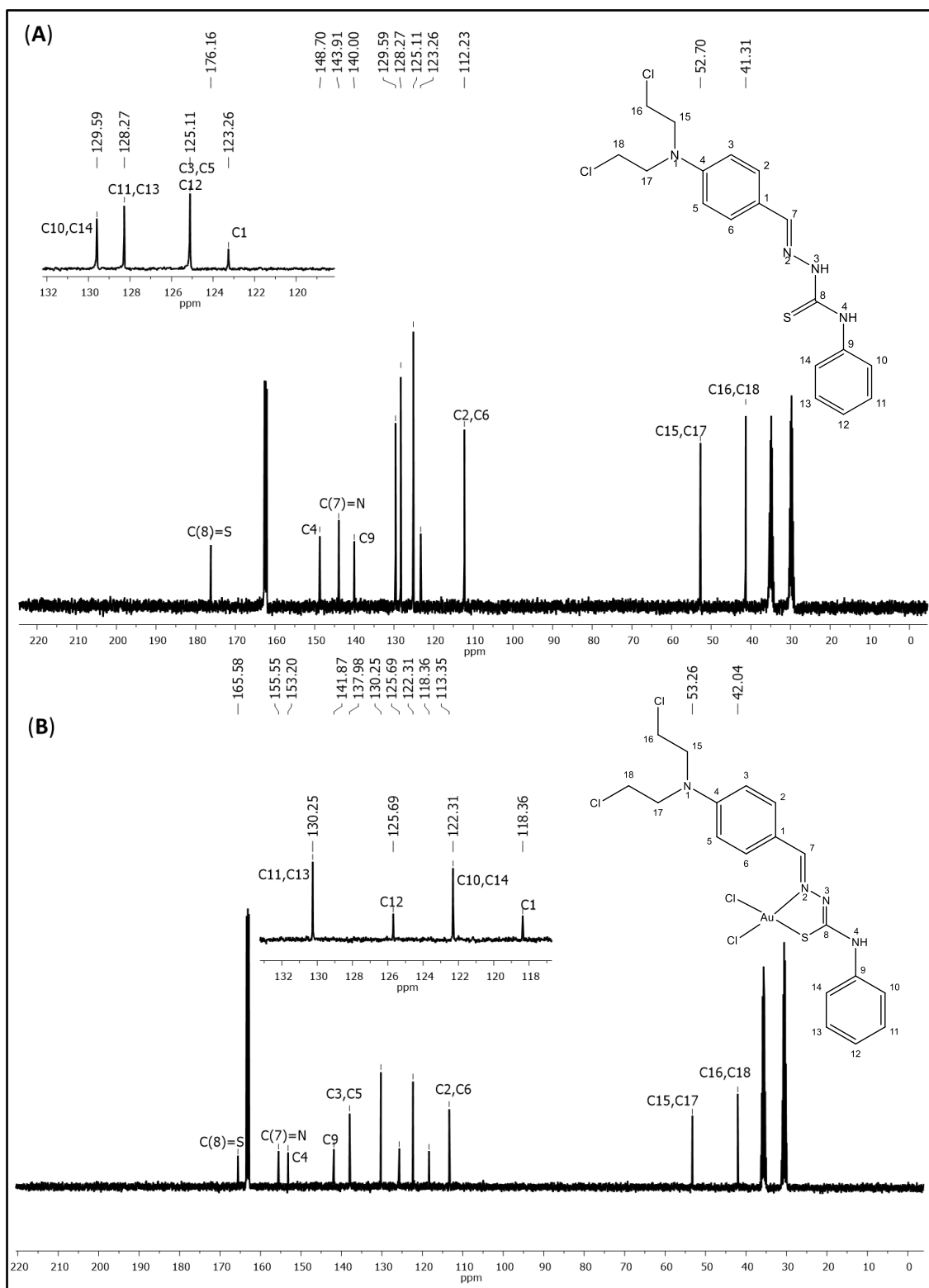


Figura 4.12: Espectros de RMN de ^{13}C (a 100MHz): (A) ligante **HL5** e (B) complexo (**5**), obtidos em $\text{DMF-}d_7$.

4.2.1.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Na Tabela 4.11 estão apresentados os números de onda máximos das bandas observadas nos espectros vibracionais dos ligantes **HL5-HL7** e dos complexos (**5-7**) na região de 4000 a 400 cm⁻¹. Os espectros de **HL5** e (**5**) estão apresentados na Figura 4.13.

Nos espectros dos ligantes, observam-se bandas em torno de 3374-2962 cm⁻¹ as quais foram atribuídas aos estiramentos dos grupos N(3)-H e N(4)-H.¹⁰ As bandas em 1600 cm⁻¹, 1602 cm⁻¹ e 1610 cm⁻¹ referentes ao estiramento da ligação C=N e as bandas em 696 cm⁻¹, 726 cm⁻¹ e 628 cm⁻¹ referentes ao estiramento da ligação C=S foram observadas em **HL5**, **HL6** e **HL7** respectivamente. Para os complexos, pode-se observar a ausência do estiramento referente a N(3)-H, em concordância com a proposta de desprotonação da tiossemicarbazona após a coordenação ao metal. A banda referente ao estiramento C=S deslocou-se para menor número de onda, nos complexos, indicando a coordenação pelo enxofre. Uma absorção larga em 3396 cm⁻¹ no espectro de (**6**) e em 3420 cm⁻¹ no espectro de (**7**) foi atribuída à vibração $\nu(\text{O-H})$.

Tabela 4.11: Atribuições das principais bandas (ν/cm^{-1}) de absorção na região do infravermelho dos ligantes (**HL5**), (**HL6**) e (**HL7**) e dos complexos (**5**), (**6**) e (**7**).

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C-S})$
HL5	-	3248, 3154-2982	1600	696
(5)	-	3372	1606	660
HL6	-	3246, 3146-2978	1602	726
(6)	3396	3262	1608	708
HL7	-	3374,3150-2962	1610	628
(7)	3420	3352	1606	600

¹⁰ K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds Part B. 6th ed. New York: Wiley, 2009.

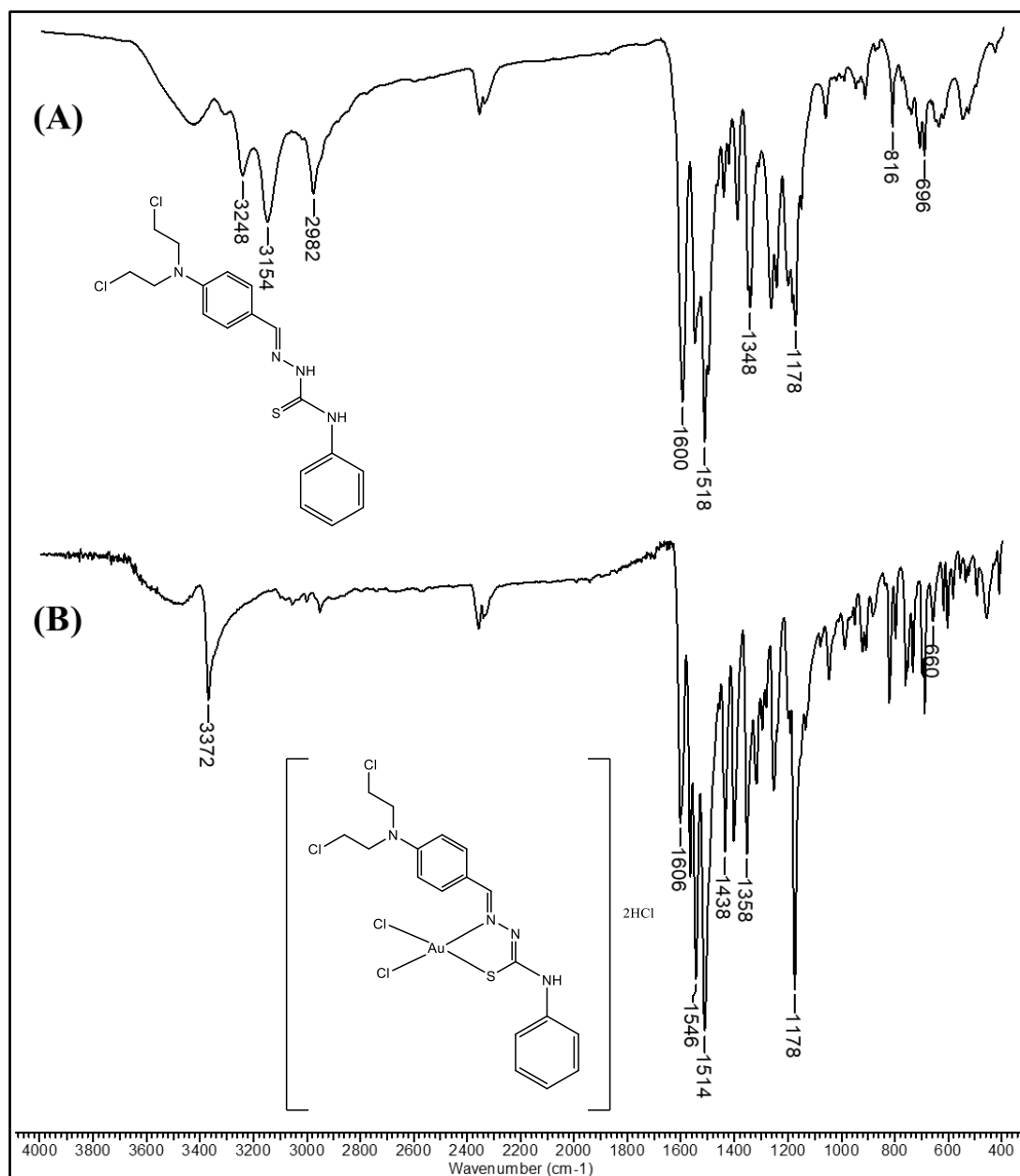


Figura 4.13: Espectros de absorção na região do infravermelho: (A) do ligante **HL5** e (B) do complexo (**5**), obtidos em pastilhas de KBr.

4.2.1.3. Cristalografia de Raios X

Cristais de **HL6** foram obtidos a partir de uma solução de metanol. A estrutura cristalográfica foi obtida em um difratômetro Oxford-Diffraction GEMINI (LabCri) com fonte de grafite MoK α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Os dados foram coletados a temperatura ambiente (293 K) utilizando o programa CrysAlisPro.² Foi aplicada a correção de absorção baseada no método de varredura múltipla. Usando Olex2.³ A estrutura foi resolvida com o programa de solução de estrutura XT15.⁴ O procedimento de refinamento de mínimos quadrados de matriz completa em F^2 com parâmetros térmicos anisotrópicos

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

foi realizado usando o pacote de refinamento XL16.⁵ Os parâmetros de deslocamento atômico posicionais e anisotrópicos foram refinados para todos os átomos não hidrogenados. Os átomos de hidrogênio foram colocados geometricamente e os parâmetros posicionais foram refinados usando um modelo de equitação.

Na Tabela 4.12 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina. Na Figura 4.14 está representado o diagrama ORTEP do composto. Os principais valores de comprimentos e ângulos de ligação estão apresentados nas tabelas 4.13 e 4.14 respectivamente.

As distâncias e os ângulos de ligação são bem similares aos encontrados na literatura para tiossemicarbazonas com estruturas semelhantes¹¹. A distância da ligação C8-S1 foi 1,687(3) Å e a distância de ligação de C1-C7 foi 1,447(4) Å. Para as ligações N2-C7 e N2-N3 as distâncias foram 1,276(3)Å e 1,379(3)Å respectivamente. De acordo com os dados obtidos, a proposta de estrutura do ligante foi confirmada.

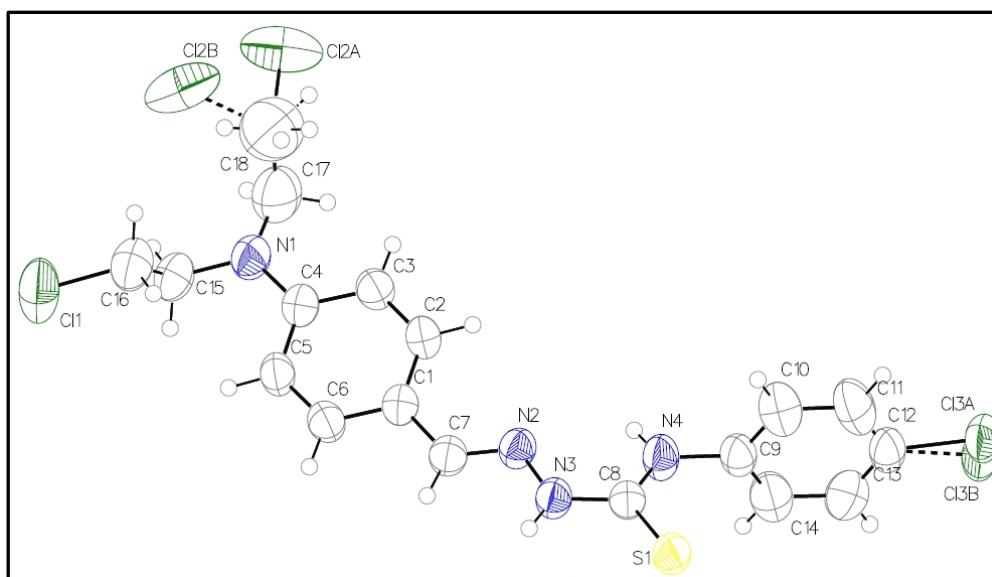


Figura 4.14: Diagrama ORTEP para a tiossemicarbazona **HL6**.

¹¹ M. A. Soares, *Bioorg. & Med. Chem.* 20 (2012) 3396.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.12: Resumo da coleção de dados cristalográficos e os resultados do refinamento da estrutura cristalográfica dos ligantes (**HL6**).

Dados	HL6
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₁₉ CL ₆ N ₄ S
Massa molecular (g mol ⁻¹)	429,79
Temperatura (K)	293(2)
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclinico, P21/c
Parâmetros da célula unitária	
a (Å)	16.5839(3)
b (Å)	13.0854(2)
c (Å)	9.71070(10)
α (°)	90
β (°)	101.354(2)
γ (°)	90
V (Å ³)	2066.05(6)
Z	4
Densidade calculada (mg m ⁻³)	1.362
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	5.035
F(000)	864.0
Intervalo de θ (°)	5.436 - 133.122
Faixa de índices de Miller	-19 ≤ h ≤ 19 -15 ≤ k ≤ 15 -11 ≤ l ≤ 11
Reflexões coletadas	32388
Reflexões únicas (R _{int})	3640 [R _{int} = 0.0527, R _{sigma} = 0.0199
Dados/restrições/parâmetros	3640/0/255
S	1.038
Índices de R final [I>2σ(I)]	R1 = 0.0557, wR2 = 0.1534
Índices de R (todos os dados)	R1 = 0.0665, wR2 = 0.1661
Δρ _{máx} e Δρ _{mín} (e Å ⁻³)	0.65 e -0.32

Tabela 4.13: Principais comprimentos (Å) de ligação do ligante (**HL6**). Desvio padrão entre parênteses.

Ligação	HL6
C1-C7	1,447(4)
N2-C7	1,276(3)
N2-N3	1,379(3)
N4-C8	1,343(4)
N4-C9	1,426(4)
C8-S1	1,687(3)

Tabela 4.14: Principais ângulos (°) de ligação do ligante (**HL6**). Desvio padrão entre parênteses.

Ângulo	HL6
N4-C8-S1	124,1(2)
C7-N2-N3	115,4(2)
C8-N4-C9	123,2(2)
C8-N3-N2	120,1(2)
N3-C8-S1	120,2(2)
N3-C8-N4	115,6(2)

4.3 Avaliação da atividade biológica da hidrazona, das tiossemicarbazonas e seus complexos

4.3.1 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos compostos foi testada utilizando as linhagens celulares NCI-H460 (câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de mama), HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humanas, usada como modelo de células não tumorais) e melanomas B16F10, A375 e A2058. Os compostos testados foram os ligantes **HL2**, **HL5**, **HL6** e **HL7**, os complexos **(5)**, **(6)** e **(7)** e o reagente de partida nas sínteses, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Os compostos foram submetidos à determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CI_{50}).

A atividade citotóxica das tiossemicarbazonas livres e seus complexos já é bastante estudada na literatura.^{12,13,14,15,16,17,18} Na tentativa de melhorar essa atividade, adicionamos um grupo alquilante N-mostarda à estrutura. Esse grupo tem sido descrito na literatura com potencial atividade antitumoral e o mecanismo de ação envolve a ligação ao DNA.¹⁹

Conforme mostrado na Tabela 4.15, apenas **HL5** exibiu efeitos citotóxicos. Estes efeitos foram observados apenas nas células de melanoma B16F10 com CI_{50} de $17,1 \pm 3,1$. Em contraste, **HL5** não induziu efeitos citotóxicos em células HUVEC não-malignas. Considerando a atividade na célula HUVEC, o ligante foi no mínimo 12 vezes mais ativo frente a linhagem tumoral. Outro fator a ser considerado é a especificidade desse composto para apenas essa linhagem celular tumoral B16F10.

Observou-se uma diminuição na atividade do complexo **(5)** quando comparado ao ligante, na mesma linhagem tumoral. O complexo **(5)** apresentou atividade comparável ao sal de ouro frente a linhagem B16F10, no entanto, o complexo foi seletivo pois não apresentou atividade frente as células sadias HUVEC, ao contrário do sal de ouro que foi tóxico nessas células.

O ligante **HL6** e seu complexo **(6)** não apresentaram atividade frente a nenhuma linhagem celular testada, enquanto o ligante **HL7** foi moderadamente tóxico apenas nas células sadias. O

¹² 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) 3396-3409

¹³ V. Vutey, S. Castelli, I. D'Annessa, L. B. P. Sâmia, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, A. Desideri, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 606 (2016) 34-40

¹⁴ P. J. Jansson, D. S. Kalinowski, D. J.R. Lane, Z. Kovacevic, N. A. Seebacher, L. Fouani, S. Sahni, A. M. Merlot, D. R. Richardson, *Pharm. Res.* 100 (2015) 255–260.

¹⁵ J. Qia, J. Dengc, K. Qiana, L. Tiana, J. Lib, K. Heb, X. Huangb, Z. Chengd, Y. Zhengb, Y. Wanga, *Eur. J. Med. Chem.* 134 (2017) 34-42.

¹⁶ A. A. Oliveira, G. M. C. Perdigão, L. E. Rodrigues, J. G. da Silva, E. M. Souza-Fagundes, J. A. Takahashi, W. R. Rocha, H. Beraldo, *Dalton Trans.* 46 (2017) 918–932.

¹⁷ J. A. Lessa, J. C. Guerra, L. F. Miranda, C. F.D. Romeiro, J. G. Da Silva, I. C. Mendes, N. L. Speziali, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1729–1739.

¹⁸ G. L. Parrilha, K. S. O. Ferraz, J. A. Lessa, K. N. Oliveira, B. L. Rodrigues, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 537-544.

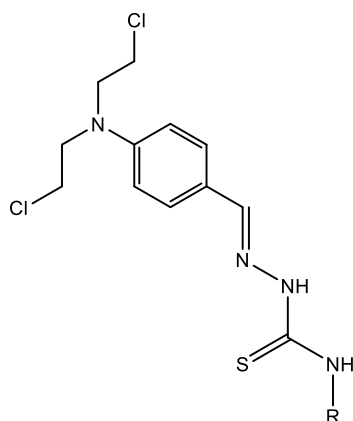
¹⁹ S. Karmakar, K. Purkait, S. Chatterjee, A. Mukherjee, *Dalton Trans.* 45 (2016) 3599–3615.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

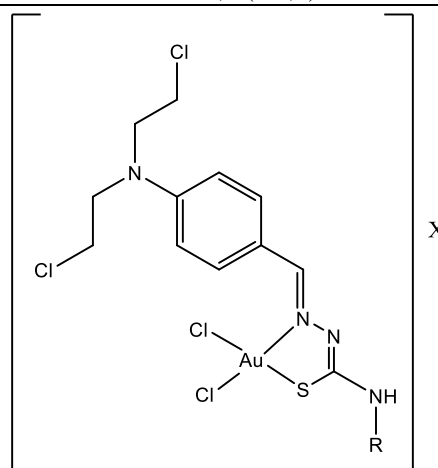
complexo (7) apresentou uma baixa atividade frente à linhagem MCF-7, na mesma ordem de grandeza do sal de ouro.

Tabela 4.15: Efeito citotóxico (CI₅₀) das tiossemicarbazonas (HL5), (HL6) e (HL7), dos complexos (5), (6) e (7) e do sal H₂AuCl₄.3H₂O, frente as linhagens celulares B16F10, NCI-H460, MCF-7 e HUVEC. Os dados são expressos como média ± erro padrão.

Compostos	Valores de CI ₅₀ (μM)			
	B16F10	NCI-H460	MCF-7	HUVEC
HL5	17,17 (± 3,1)	>200	>200	>200
(5)	73,28 (± 6,6)	>200	>200	>200
HL6	>200	>200	>200	>200
(6)	>200	>200	>200	>200
HL7	>200	>200	>200	52,3 (± 8,5)
(7)	>200	>200	133,2 (± 5,0)	>200
H ₂ AuCl ₄ .3H ₂ O	67,6 (± 9,2)	>200	108,4 (± 7,6)	86,6 (± 6,2)



R= Ph (HL5)
p-ClPh (HL6)
 CH₃ (HL7)



R= Ph; X= 2HCl (5)
 R= *p*-ClPh; X= 2HCl; 2H₂O (6)
 R= CH₃; X= 2HCl; H₂O (7)

Assim, para avaliar ainda mais os efeitos citotóxicos de HL5 contra melanoma, estendemos o teste de viabilidade celular a outras linhagens de melanomas. Na tentativa de relacionar estrutura/atividade, também investigamos os efeitos citotóxicos da hidrazona HL2. Enquanto HL2 não apresentou atividade, HL5 apresenta efeitos citotóxicos nas células de melanoma A2058, enquanto que as células de melanoma A375 foram resistentes a HL5 após 24 horas do tratamento (Tabela 4.16).

Portanto, HL5 foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células de melanoma B16F10 (murino) e A2058 (humano) sem afetar a viabilidade das células endoteliais humanas, sugerindo que este composto ou seus análogos poderiam ser explorados como candidatos a fármacos antimelanomas.

Tabela 4.16: Efeito citotóxico (CI₅₀) de **HL5** e **HL2**, frente as linhagens celulares de melanomas B16F10, A2058, A375 e frente a linhagem celular sadia HUVEC. Os dados são expressos como média ± erro padrão.

Compostos	Valores de CI ₅₀ (μM)			
	B16F10	A2058	A375	HUVEC
HL5	17,17 ± 3,1	81,3 ± 9,5	>200	>200
HL2	>200	>200	>200	>200

A partir dos resultados obtidos para a atividade citotóxica dos compostos, observa-se que a estratégia de adicionar o grupo N-mostarda, com atividade antitumoral previamente conhecida, à estrutura da tiossemicarbazona/hidrazona não se mostrou tão eficiente para a maioria dos compostos sintetizados. No entanto, vale a pena ressaltar que para o ligante **HL5** essa estratégia se mostrou bastante promissora devido à alta seletividade desse composto frente a uma linhagem tumoral específica. De qualquer modo, uma investigação sobre os possíveis alvos biológicos desse composto mostra-se de extrema relevância.

A complexação ao ouro, de uma forma geral, não resultou em uma melhora na atividade, no entanto, para o complexo (**5**) a melhor seletividade quando comparado ao sal de ouro sugere que o ligante, com sua atividade citotóxica intrínseca, ajude a direcionar o metal coordenado para as células tumorais.

Uma vez que a alquilação do DNA por compostos contendo o grupo N-mostarda está diretamente relacionada ao par de elétrons disponível no nitrogênio, pode-se sugerir que o aumento da conjugação após a inserção do grupo mostarda à estrutura da tiossemicarbazona diminui a disponibilidade do par de elétrons do nitrogênio mostarda, afetando assim a ligação ao DNA. Após a complexação, a desprotonação da tiossemicarbazona aumenta ainda mais essa conjugação tornando o par de elétrons do nitrogênio do grupo mostarda ainda menos disponível.

4.3.2 Avaliação de morte celular

Devido ao efeito citotóxico de **HL5** em células de melanomas, foi realizado um estudo de mecanismo de ação desse composto. A redução da viabilidade das células de melanoma por **HL5** pode ser o resultado de morte celular por meio de apoptose ou indução de necrose. Para isso, realizou-se citometria de fluxo usando o ensaio de Anexina V/IP.

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

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

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}

Conforme mostrado na Figura 4.15, o tratamento de células B16F10 com 10 e 20 μM de **HL5** induz a morte celular por necrose nas células de melanoma. Além disso, houve um aumento das células B16F10 marcadas com IP após o tratamento com **HL5**, indicando comprometimento da viabilidade celular. Assim, podemos sugerir que **HL5** mostra efeitos de antimelanoma através da indução da morte celular por necrose em células B16F10.

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.

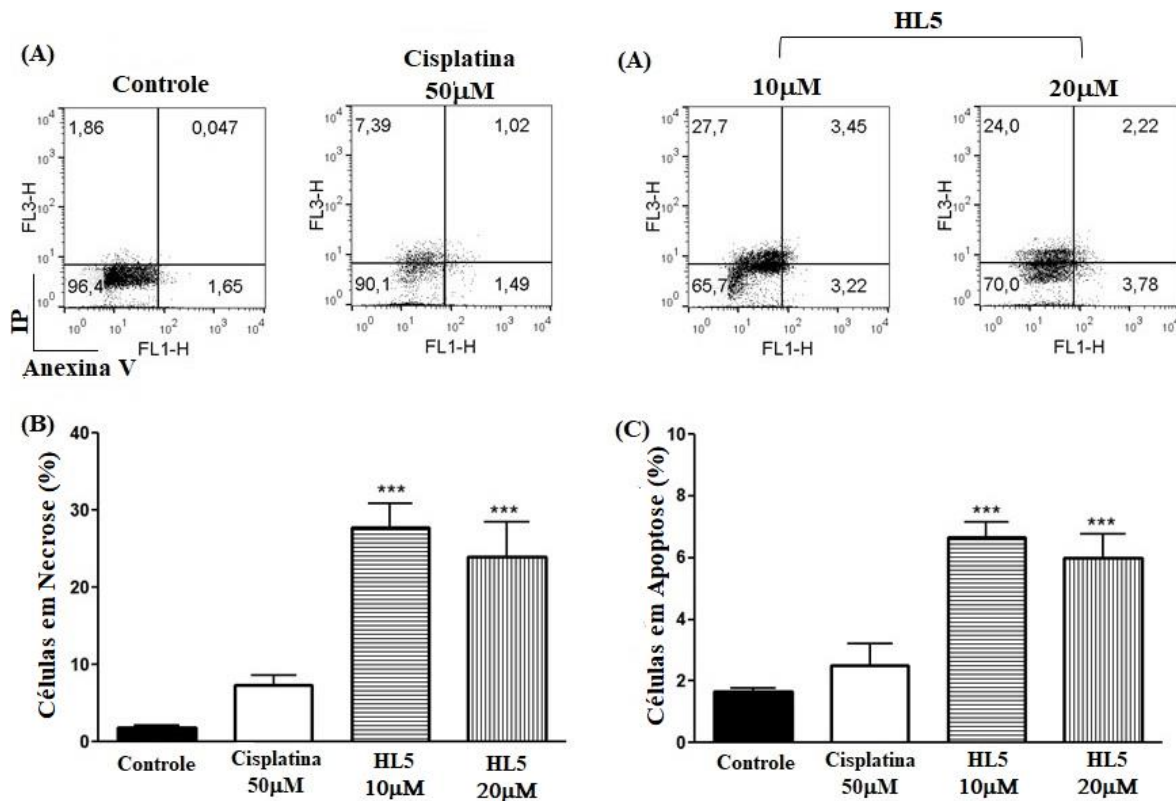


Figura 4.15: Necrose em células de melanoma B16F10 por **HL5**. As células foram tratadas por 12 h com **HL5** (10 e 20µM) ou cisplatina 50µM (controle positivo para apoptose), coradas duas vezes com anexina V/PI e analisadas por citometria de fluxo (potenciômetros de pontos em (A)). A % de células necróticas (anexinV-/PI+) e apoptóticas (anexinV+/PI+ e anexinV+/PI-) foram consideradas separadamente. **HL5** aumentou a população celular necrótica e apoptótica (*** p <0,001 versus controle), embora a via principal da morte celular fosse necrose. Todos esses dados são significativos da porcentagem de células positivas ± DP (n = 3).

4.3.3 Investigação dos níveis de expressão das proteínas das vias de sinalização apoptóticas

Os efeitos de **HL5** sobre a ativação da morte celular por necrose foram analisados com mais detalhes por Western Blot. Assim, as células B16F10 foram tratadas durante 24h com **HL5** e cisplatina (controle positivo). Para investigar os eventos moleculares iniciados pelo tratamento com **HL5**, as vias intrínsecas (mitocondriais) foram avaliadas.

Quando acontece qualquer tipo de lesão (irreparável) na célula isso desencadeia um processo de morte celular programada (Apoptose). O processo de apoptose acontece quando ocorre uma mudança na permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando em ruptura dessa membrana e a liberação de moléculas para o citosol, como por exemplo o Citocromo C, que ativam as enzimas caspases que são responsáveis pela ativação do processo de apoptose.

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Dentro das células existe um equilíbrio de proteínas denominadas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bcl-xL) e pró-apoptóticas (BAD) que impedem a célula de entrar em processo de apoptose de forma aleatória. Quando esse equilíbrio é modificado, ocorre uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial e o processo de morte celular pode ser desencadeado.

Em células tumorais há uma elevada expressão de proteínas anti-apoptóticas responsáveis pela resistência apresentada aos quimioterápicos pois, impedem que a célula entre em apoptose levando a um aumento do tumor.

A clivagem de PARP, um substrato de ativação de caspase foi observada apenas nas células tratadas com cisplatina (controle positivo). Consequentemente, houve um aumento na ativação da caspase-3 de células tratadas com cisplatina. Em contraste, **HL5** não induziu a clivagem da caspase-3 e caspase-9 em células B16F10. No entanto, **HL5** induziu uma diminuição da proteína antiapoptótica Bcl2, que por sua vez pode afetar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Figura 4.16). Com a redução da expressão de Bcl2, as células podem se tornar mais sensíveis a drogas quimioterapêuticas.

Observou-se uma diminuição na concentração do Citocromo C na presença de **HL5** e essa diminuição foi mais pronunciada na presença de 20 μ M de **HL5**, sugerindo assim, que o ligante não induziria a apoptose, pois a concentração de Citocromo C disponível para ser liberado para o citosol seria menor (Figura 4.16).

HL5 leva ao aumento de BAD, uma proteína, que é um regulador da permeabilidade celular mitocondrial (Figura 4.16). O Bcl2 liga-se às proteínas e, assim, bloqueia a sua atividade proapoptótica. Portanto, o estudo mostra que **HL5** provavelmente aumenta a sensibilidade das células aos agentes quimioterápicos. Assim, **HL5** poderia ser usado em associação com medicamentos antimelanoma. No entanto, é necessária uma maior investigação sobre este mecanismo em estudos futuros.

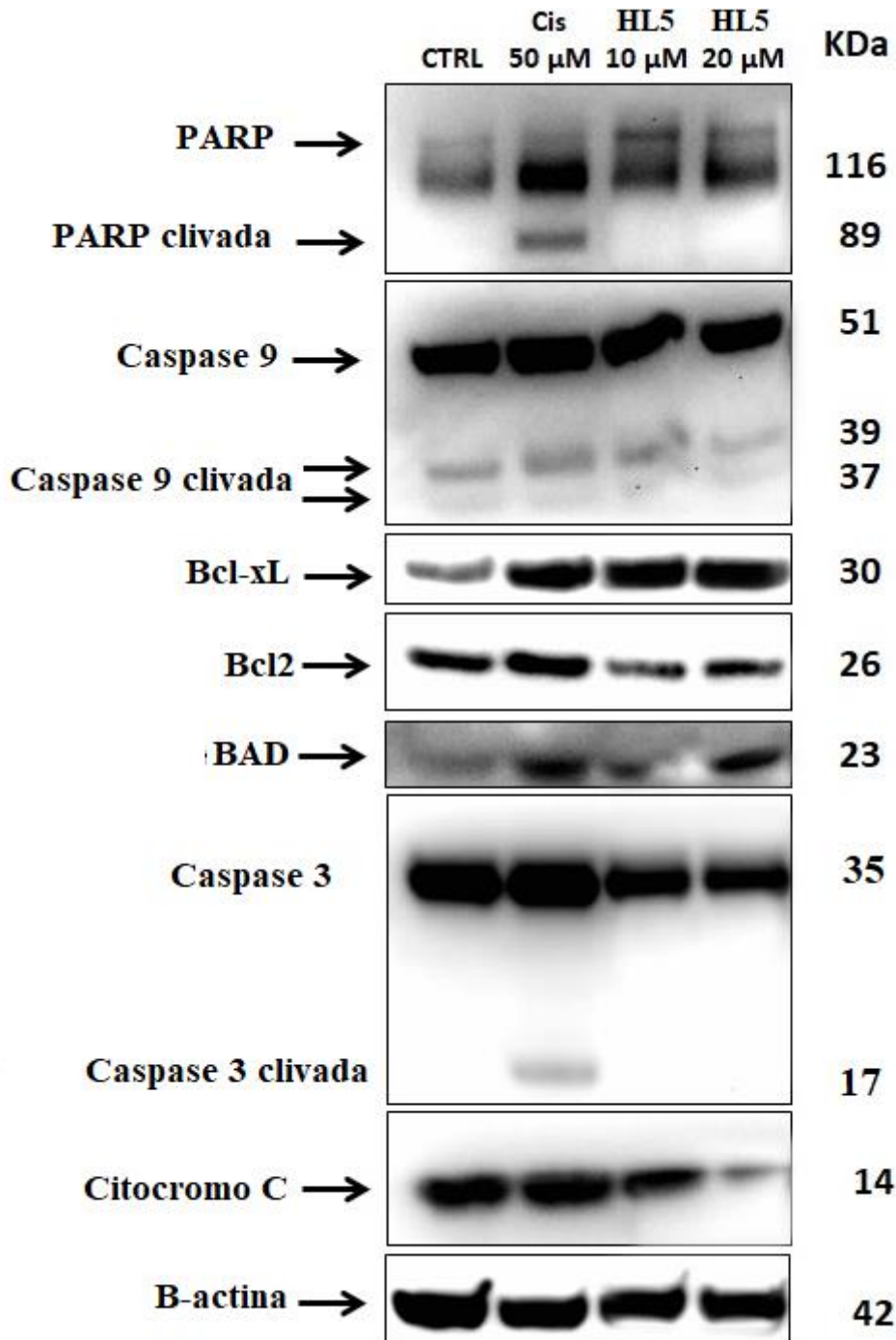


Figura 4.16: Redução da expressão de Bcl-2 em células B16F10 por **HL5**. A expressão das proteínas da morte celular foi avaliada após o tratamento das células B16F10 durante 24h com **HL5** (10 e 20μM) ou 50μM de cisplatina (controle positivo para a apoptose), lise celular e análise Western Blot. **HL5** não apresentou característica apoptótica, mas afetou as proteínas mitocondriais: redução de Bcl-2 associada ao aumento da expressão de BAD. As imagens da membrana Western blot são representativas de três experimentos independentes.

4.3.4 Estudos de interação com DNA plasmidial

Foi realizado um estudo de interação com o DNA, como forma de avaliação de um possível alvo biológico para a citotoxicidade. Os compostos testados foram as tiossemicarbazonas **HL5**, **HL6**, **HL7**, os complexos de ouro(III) (**5**), (**6**), (**7**) e o precursor $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4.17.

O efeito dos compostos testados sobre a conformação do DNA foi avaliado por mobilidade eletroforética do plasmídeo pUC-19 após tratamento com os compostos. Na presença de cisplatina, um decréscimo na mobilidade eletroforética foi observado em todas as formas, o que deve estar associado a uma interação com o DNA formando ligações cruzadas intrafitas. Na concentração testada, **HL5**, **HL6**, **HL7**, (**5**), (**6**), (**7**) e HAuCl_4 não alteraram significativamente a mobilidade eletroforética do DNA e também não se observou clivagem do DNA. Assim, os estudos revelaram que os compostos não interagem diretamente com o DNA, ou, se interagem, não formam adutos estáveis.

Portanto, o efeito antiproliferativo do ligante **HL5** observado nas células tumorais não ocorre por meio da interação direta desse composto com o DNA. Apesar de já saber que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas envolve principalmente a inibição da RDR²³, o estudo de interação com o DNA por meio de eletroforese foi realizado na tentativa de verificar se a presença do grupo alquilante N-mostarda poderia estar interferindo no mecanismo de ação do composto.

No caso do complexo (**5**) o mecanismo de sua ação citotóxica não deve envolver ligação direta do metal à biomolécula, o que está em concordância com dados reportados na literatura, que sugerem que o mecanismo de ação de complexos de ouro envolve principalmente a ligação desses compostos a proteínas, como por exemplo, TrxR^{24,25,26,27} e Topoisomerase^{28,29,30}.

²³ H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 41-39

²⁴ A. Garcia, R. C. Machado, R. M. Grazul, M.T P. Lopes, C. C. Corrêa, H. F. Dos Santos, M. V. Almeida, H. Silva, *J Biol. Inorg. Chem.* 21 (2016) 275-292.

²⁵ T. Zou, C. T. Lum, Chun-Nam Lok, Wai-Pong To, Kam-Hung Low, Chi-Ming Che, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 5810-5814

²⁶ 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) 515-526.

²⁷ T. T. Tavares, G. C. Azevedo, A. Garcia, A. G. Carpanez, P. M. Lewer, D. Paschoal, B. L. Müller, H. F. Dos Santos, R. C. Matos, H. Silva, R. M. Grazul, A. P. S. Fontes, *Polyhedron* 132 (2017) 95-104.

²⁸ S.A. Pérez, C. Haro, C. Vicente, A. Donaire, A. Zamora, J. Zajac, H. Kostrhunova, V. Brabec, D. Bautista, J. Ruiz, *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 1524-1537.

²⁹ C. R. Wilson, A. M. Fagenson, W. Ruangpradit, M. T. Muller, O. Q. Munro, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 7889-7906.

³⁰ K. J. Akerman, A. M. Fagenson, V. Cyril, M. Taylor, M. T. Muller, M. P. Akerman, O. Q. Munro, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 5670-5682.

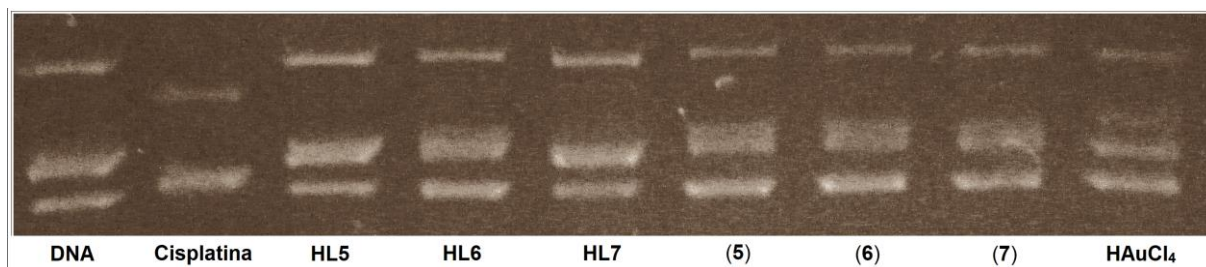


Figura 4.17: Estudo de eletroforese em gel de agarose com o DNA plasmidial pUC19, tratado com cisplatina, **HL5**, **HL6**, **HL7**, (5), (6), (7) e HAuCl₄, a 100 μM em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Período de incubação 24h a 37 °C.

4.3.5 Investigações teóricas sobre a capacidade de alquilação dos compostos base de Schiff contendo o substituinte nitrogênio mostarda

O mecanismo proposto de alquilação do DNA por compostos contendo o nitrogênio mostarda está representado na Figura 4.18. Estudos teóricos foram realizados com o objetivo de explicar a razão pela qual apenas **HL5** foi capaz de induzir efeitos citotóxicos em células de melanoma, enquanto todos os outros compostos sob investigação revelaram ser inativos.

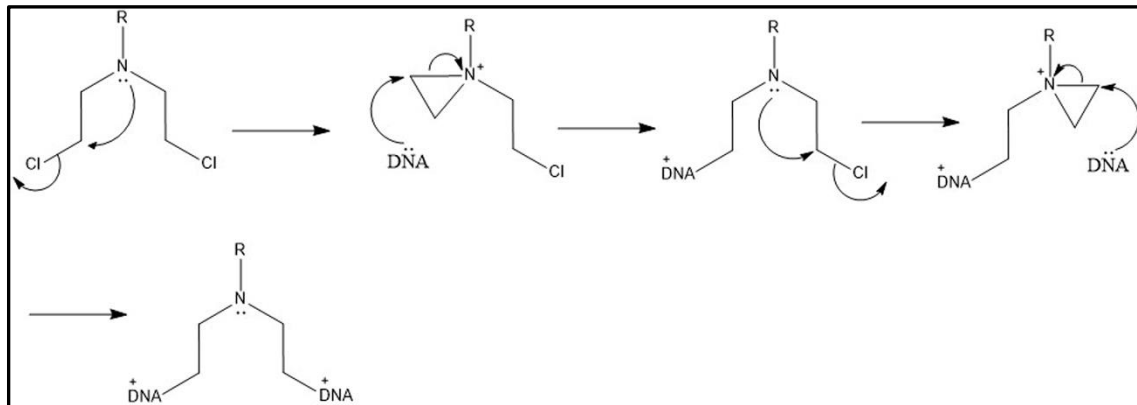


Figura 4.18: Mecanismo de alquilação do DNA pelo agente alquilante nitrogênio mostarda.

Para verificar esta hipótese, as energias de reação para os compostos em estudo foram estimadas por meio da Teoria do Funcional de Densidade (DFT). A Tabela 4.17 mostra as energias de reação calculadas usando diferentes funcionais de troca/correlação e conjuntos de base, para a etapa de reação de ciclização da mostarda nitrogenada (Figura 4.19).

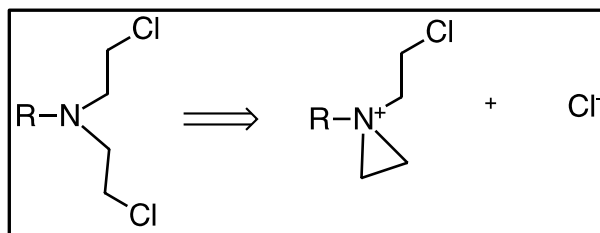


Figura 4.19: Etapa de reação de ciclização da mostarda nitrogenada

Tabela 4.17: Energias de reação (kcal mol⁻¹) estimadas utilizando diferentes funcionais de troca/correlação e conjuntos base, para a etapa de reação de ciclização da mostarda.

Compostos	B3LYP		PBE	
	D95	ccpv-dz	D95	ccpv-dz
HL5	144,0	142,7	147,1	145,5
HL6	145,5	144,5	147,6	147,4
HL7	143,2	141,7	146,2	144,4
HL2	144,3	142,5	147,8	145,7
5¹	-17,50	-3,11	-18,75	-6,24
6¹	-17,07	-2,21	-19,17	-5,18
7¹	-17,80	-3,43	-19,14	-6,65

¹Os átomos de ouro foram descritos pelo potencial de núcleo efetivo relativístico LanL2DZ.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.17 pode-se observar que o grupo tiossemicarbazona/hidrazona não afeta as energias de reação. As diferenças estão no intervalo de erro esperadas para os cálculos DFT de cerca de 5 kcal mol⁻¹. Do ponto de vista termodinâmico, a diferença na atividade biológica não está relacionada à reação de ciclização da mostarda. As Tabelas 4.18 e 4.19 mostram que os orbitais de fronteira dos diferentes compostos possuem características semelhantes no grupo nitrogênio mostarda. Esta é também uma boa evidência de que sua reatividade não é afetada pela presença do grupo tiossemicarbazona/ hidrazona da molécula.

Tabela 4.18: Densidade eletrônica dos orbitais de fronteira calculadas no nível de teoria B3LYP/D95 para os ligantes **HL2**, **HL5-HL7**.

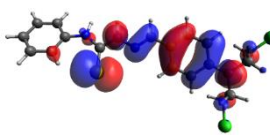
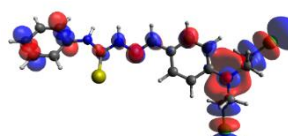
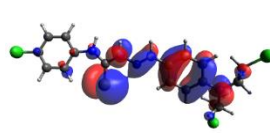
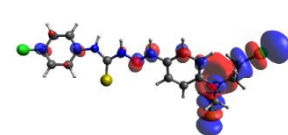
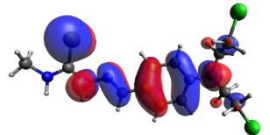
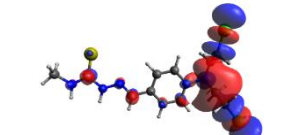
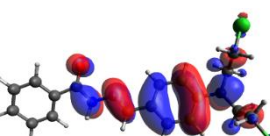
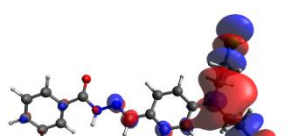
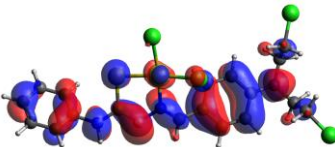
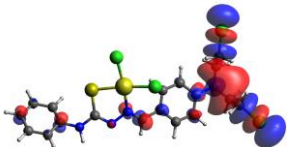
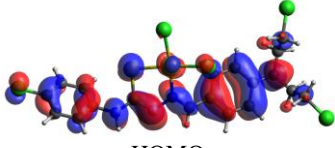
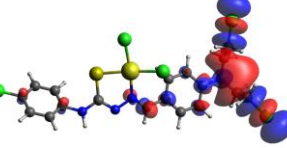
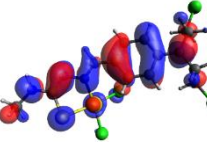
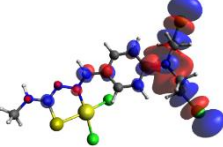
Compostos	HOMO	LUMO
HL5	 HOMO-1	 LUMO+3
HL6	 HOMO	 LUMO+4
HL7	 HOMO-1	 LUMO+2
HL2	 HOMO	 LUMO+4

Tabela 4.19: Densidade eletrônica dos orbitais de fronteira calculadas no nível de teoria B3LYP/D95 para os complexos **5**, **6** e **7**.

Compostos	HOMO	LUMO
5	 HOMO	 LUMO+5
6	 HOMO	 LUMO+5
7	 HOMO	 LUMO+3

Pode-se argumentar que a eletrofilicidade do grupo nitrogênio mostarda pode ser o fator mais importante para a atividade citotóxica. Portanto, calculamos a energia de reação deste grupo com BF_3 , uma espécie nucleofílica típica (Figura 4.20). Os resultados apresentados na Tabela 4.20 indicam que a influência do grupo R na energia de reação é insignificante e não explica a atividade biológica distinta de **HL5**.

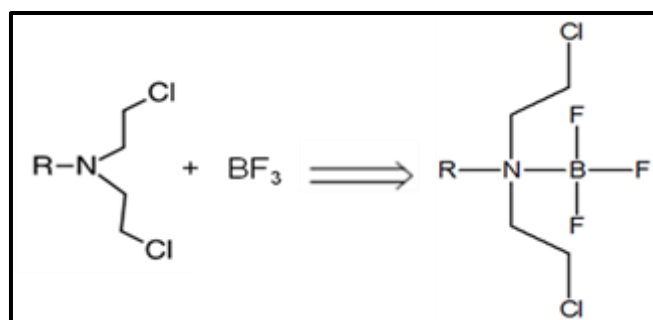


Figura 4.20: Reação do grupo nitrogênio da mostarda com a espécie nucleofílica BF_3 .

Capítulo 4: Hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de Au(III) das tiossemicarbazonas.

Tabela 4.20: Energias de reação (kcal mol⁻¹) estimadas utilizando diferentes funcionais de troca/correlação e conjuntos base, para a reação do nitrogênio com BF₃.

Compostos	B3LYP		PBE	
	D95	ccpv-dz	D95	ccpv-dz
HL5	-19,81	-4,76	-21,10	-7,91
HL6	-19,47	-3,89	-21,72	-6,85
HL7	-20,21	-5,17	-21,57	-8,33
HL2	-20,00	-5,10	-21,12	-8,04
5¹	-17,50	-3,11	-18,75	-6,24
6¹	-17,07	-2,21	-19,17	-5,18
7¹	-17,80	-3,43	-19,14	-6,65

¹Os átomos de ouro foram descritos pelo potencial de núcleo efetivo relativístico LanL2DZ.

As diferenças de energia muito pequenas entre os compostos sugerem que essas diferenças não podem ser responsáveis pelo fato de que apenas **HL5** mostra efeitos citotóxicos enquanto que **HL6**, **HL7** e **HL2** estão inativos. Por isso, podemos concluir que a alquilação do DNA não está envolvida no mecanismo de ação de **HL5** ou, se estiver, outras vias celulares são determinantes para seus efeitos citotóxicos.

Os valores de logP para os compostos foram logP = 5,08 (**HL5**), logP = 6,07 (**HL6**), logP = 2,53 (**HL7**) e logP = 3,20 (**HL2**). Desse modo, diferenças no caráter lipofílico poderiam ser responsáveis pelo fato de que apenas **HL5** apresentou ação citotóxica.

Capítulo 5. Conclusões

No presente trabalho foram investigados possíveis candidatos a fármacos antitumorais derivados de bases de Schiff funcionalizadas com os grupos farmacofóricos chalcona e nitrogênio mostarda, assim como seus complexos metálicos.

A primeira estratégia utilizada foi a síntese de complexos de ouro(III), platina(II), paládio(II) e cobre (II) com 3-(4-bromofenil)-1-piridina-2-ilprop-2-en-1-ona tiossemicarbazona (**HL1**), derivada de chalcona.

A atividade citotóxica de **HL1** e seus complexos [Au(L1)Cl]Cl (**1**), [Pt(L1)Cl]0,5KCl (**2**), [Pd(L1)Cl]KCl (**3**) e [Cu(PyCT4BrPh)Cl] (**4**) foi avaliada frente as linhagens de células leucêmicas (HL-60; Jurkat, THP-1), e células de tumor sólido (adenocarcinoma mamário MCF-7, carcinoma mamário MDA-MB 231, tumor de cólon retal HCT-116) e frente à linhagem de células não tumorais VERO.

Os complexos (**2**) e (**3**) mostraram-se inativos até a concentração máxima testada de 1µM. O complexo (**1**) revelou ser mais promissor que o complexo (**4**) contra a linhagem MDA-MB 231 e foi cerca de quatro vezes mais ativo que o ligante **HL1** frente a células leucêmicas Jurkat. A coordenação ao ouro melhorou a atividade frente a todas as células, com exceção de HL-60, quando comparada ao ligante **HL1**. O complexo (**4**) apresentou melhor atividade contra as células Jurkat, THP-1 e MCF-7, sendo de 6 a 13 vezes mais ativo que o ligante livre. O complexo de cobre(II) (**4**) mostrou-se em geral mais ativo do que o de ouro(III) (**1**), mas foi também mais tóxico para células sadias.

O modo de ação desses complexos foi investigado através de estudos da atividade inibitória *in vitro* das enzimas Tiorredoxina Redutase (TrxR) e Topoisomerase IB (Topo IB) e por interação com DNA plasmidial.

Enquanto a tiossemicarbazona livre não inibiu a atividade de TrxR, os complexos (**1**) e (**4**), a auranofina e o precursor de ouro mostraram-se ativos como inibidores [(**1**), $CI_{50} = 5,55 \mu M$; auranofina, $CI_{50} = 0,30 \mu M$; HAuCl₄, $CI_{50} = 0,62 \mu M$ (**4**) $CI_{50} = 9,63 \mu M$]. Embora HAuCl₄ não tenha exibido atividade citotóxica, esse composto inibe a atividade da TrxR, sugerindo que seu caráter hidrofílico provavelmente impede sua passagem pela membrana celular. Por outro lado, o complexo (**1**), além de inibir a atividade da TrxR, apresentou efeito citotóxico. Assim, pode-se sugerir que o efeito inibitório de **1** está relacionado à presença do íon metálico e que a tiossemicarbazona, além de seu efeito citotóxico intrínseco, também atuou como carreador de íon ouro(III) para o interior das células. No caso do complexo (**4**), uma vez que o sal CuCl₂ não inibiu a enzima, a atividade inibitória é atribuída ao complexo em si.

O efeito inibitório de compostos selecionados sobre a atividade da topo IB foi testado, pois, de acordo com a literatura, complexos quadrado-planos com configuração d^8 exibem promissora atividade antitumoral¹ por inibição da atividade da topoisomerase.^{2,3}

O complexo (**1**) inibiu a topo IB de forma dose-dependente a partir da concentração 1,5 μM , apresentando inibição completa quando a concentração do complexo atingiu 50-100 μM . HAuCl_4 foi capaz de inibir a topo IB, mas a inibição não foi completa nas concentrações testadas. O efeito inibitório de **1** e de HAuCl_4 é aumentado quando os compostos são pré-incubados com a enzima antes da adição do DNA, indicando que o ouro interage em algum local da enzima reduzindo sua habilidade de relaxar o DNA. Comparando os experimentos da inibição de topo IB dose-dependente nas presenças de HAuCl_4 e do complexo (**1**) pode-se dizer que a coordenação do ouro com a tiossemicarbazona fez melhorar a atividade inibitória do ouro 8 a 16 vezes.

Por sua vez, o complexo (**4**) na concentração de 3 μM reduz significativamente a atividade da Topo IB, onde a inibição é quase completa, enquanto nenhum efeito inibitório foi observado após a incubação da enzima com CuCl_2 ou com a tiossemicarbazona até a concentração de 50 μM . Estes resultados indicam que o efeito observado para o complexo (**4**) não é devido à tiossemicarbazona livre ou ao íon metálico. Assim como verificado para **1**, o efeito inibitório de **4** é aumentado após pré-incubação do complexo com a enzima, sugerindo que o complexo interage com a enzima sozinha.

A partir desses resultados de inibição da Topo IB, avaliou-se a capacidade do complexo (**4**) em inibir o processo catalítico da enzima nas etapas de quebra e religação da fita do DNA. A etapa de clivagem é inibida fortemente na presença de 12 μM de **4** e a quantidade de substrato clivado é reduzida para 20%. Nas mesmas condições utilizadas na etapa de clivagem, observou-se que **4** inibiu parcialmente a etapa de religação. Para corroborar esse efeito inibitório de **4**, experimentos de docagem molecular mostraram que o complexo ocasiona um impedimento estérico responsável pela inibição das etapas de ligação ao DNA e religação das fitas.

Estudos de interação dos compostos com o DNA revelaram que os complexos (**1**) e (**4**) não interagem diretamente com o DNA na concentração estudada. De fato, o mecanismo de ação citotóxica de tiossemicarbazonas livres envolve principalmente a inibição da RDR⁴, e não a interação direta com o DNA. No caso dos complexos, estes resultados sugerem que o mecanismo de sua ação citotóxica não deve envolver ligação direta do metal à biomolécula.

Assim, atividade de inibição de Topo IB só é observada quando a tiossemicarbazona está coordenada ao cobre(II) ou ao ouro(III), o que sugere que a complexação teria o efeito de conferir ao ligante a conformação adequada para a interação com o sitio ativo da enzima. Nossos resultados indicam

¹ R.W. Sun, D.L. Ma, E.L. Wong, C.M. Che, *Dalton Trans.* (2007) 4884-4892.

² C.M. Che, F.M. Siu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 255-261

³ Y.C. Lo, T.P. Ko, W.C. Su, T.L. Su, A.H.J. Wang, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009)1082-1092.

⁴ K.S. Lovejoy, S.J. Lippard, *Dalton Trans.* (2009) 10651-10659.

a importância da coordenação aos cátions metálicos para modular os alvos biológicos das tiossemicarbazonas.

A segunda estratégia utilizada foi a síntese de hidrazonas e tiossemicarbazonas contendo o grupo farmacofórico nitrogênio mostarda e complexos de ouro(III) com as tiossemicarbazonas. Como mencionado anteriormente, a atividade citotóxica desses ligantes e de seus complexos já é bastante estudada. Na tentativa de melhorar essa atividade, adicionamos um grupo alquilante N-mostarda à estrutura. Esse grupo tem sido descrito na literatura com potencial atividade antitumoral e o mecanismo de ação envolve ligação ao DNA seguida de alquilação.⁵

Avaliou-se a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas **HL5**, **HL6** e **HL7**, dos respectivos complexos de ouro(III) (**5**), (**6**) e (**7**) e do precursor HAuCl₄ utilizando as linhagens B16F10 (melanoma), NCI-H460 (câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de mama) e HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana), usada como modelo de células não tumorais.

De uma forma geral, os compostos não foram ativos frente as linhagens testadas. No entanto, o ligante **HL5** apresentou uma atividade considerável contra a linhagem B16F10 e foi bastante seletivo, pois a atividade desse composto frente às células saudáveis foi baixa. Outro fator a ser considerado é a especificidade desse composto para apenas essa linhagem. A complexação ao ouro de uma forma geral, não foi uma estratégia interessante. No entanto, o complexo (**5**) apresentou atividade comparável ao precursor de ouro frente a linhagem B16F10 mas, ao contrário do precursor de ouro, não apresentou atividade frente as células saudáveis HUVEC.

Devido à especificidade de **HL5** frente ao câncer de melanoma, ampliaram-se os estudos desse composto para outras linhagens de melanomas. Para verificar a relação estrutura/atividade testou-se a hidrazona análoga **HL2**, mas os resultados mostraram que **HL2** não apresentou atividade citotóxica.

Foi realizado um estudo de mecanismo de ação de **HL5** em que se concluiu que o efeito antimelanoma apresentado ocorre através da indução da morte celular por necrose em células B16F10. A partir desses resultados, ativação da morte celular por necrose foi analisada com mais detalhes por Western Blot. O estudo mostrou que **HL5** provavelmente aumenta a sensibilidade das células aos agentes quimioterápicos e poderia ser usado em associação com medicamentos antimelanoma.

Estudos teóricos realizados com o objetivo de explicar a razão pela qual apenas **HL5** foi capaz de induzir efeitos citotóxicos em células de melanoma mostraram que todos os compostos investigados teriam a mesma capacidade de agir como alquilantes do DNA, sugerindo que ou a alquilação não ocorre ou, se ocorrer, não seria o principal mecanismo de ação de **HL5**. No entanto, uma vez que os valores de logP dos ligantes são muito diferentes entre si, a hipótese de que apenas **HL5** apresente a lipofilia adequada para atingir o alvo não pode ser descartada.

⁵ S. Karmakar, K. Purkait, S. Chatterjee, A. Mukherjee, Dalton Trans. 45 (2016) 3599–3615.

Estudos de interação dos compostos com o DNA revelaram que o efeito antiproliferativo de **HL5** e do complexo (**5**) observado nas células tumorais não ocorre por meio da interação direta desses compostos com o DNA.

Anexos: Artigos publicados

Metal complexes of 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone: cytotoxic activity and investigation on the mode of action of the gold(III) complex

Luciana B. P. Sâmia · Gabrieli L. Parrilha · Jeferson G. Da Silva · Jonas P. Ramos · Elaine M. Souza-Fagundes · Silvia Castelli · Venn Vutey · Alessandro Desideri · Heloisa Beraldo

Received: 15 January 2016 / Accepted: 5 April 2016 / Published online: 18 April 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Complexes [Au(PyCT4BrPh)Cl]Cl (**1**), [Pt(PyCT4BrPh)Cl]0.5KCl (**2**), and [Pd(PyCT4BrPh)Cl]KCl (**3**) were obtained with 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh). Although complexes (**2**) and (**3**) did not exhibit potent cytotoxic activity, HPyCT4BrPh and its gold(III) complex (**1**) proved to be highly cytotoxic against HL-60 (human promyelocytic leukemia) and THP-1 (human monocytic leukemia) cells, and against MDA-MB 231 and MCF-7 (human breast adenocarcinoma) solid tumor cells. Except for HL-60 cells, upon coordination to gold(III) a 2- to 3-fold increase in

the cytotoxic effect was observed. An investigation on the possible biological targets of the gold(III) complex was carried out. Complex (**1**) but not the free thiosemicarbazone inhibits the enzymatic activity of thioredoxin reductase (TrxR). The affinity of **1** for TrxR suggests metal binding to a selenol residue in the active site of the enzyme. While HPyCT4BrPh was inactive, **1** was able to inhibit topoisomerase IB (Topo IB) activity. Hence, inhibition of TrxR and Topo IB could contribute to the mechanism of cytotoxic action of complex (**1**).

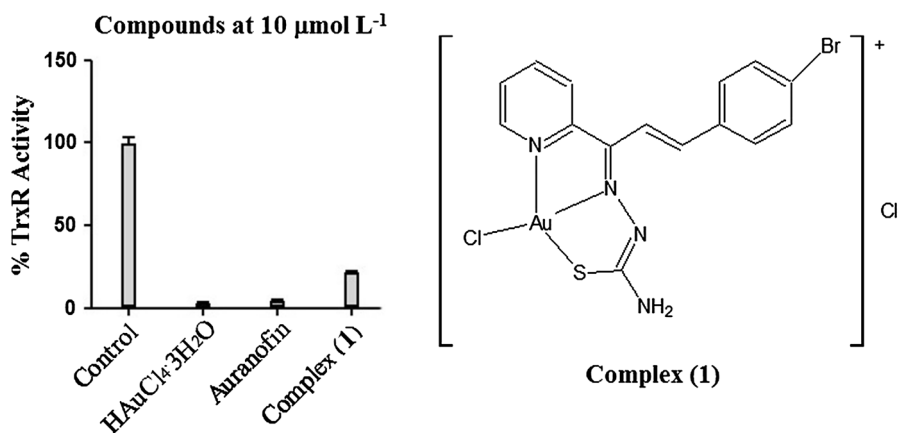
L. B. P. Sâmia · G. L. Parrilha · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br

J. G. Da Silva
Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Governador Valadares, MG 35010-177, Brazil

J. P. Ramos · E. M. Souza-Fagundes
Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

S. Castelli · V. Vutey · A. Desideri
Department of Biology, University of Rome “Tor Vergata”, Via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Rome, Italy

Graphical Abstract



Keywords Chalcone · Thiosemicarbazone · Metal complexes · Cytotoxic activities · Thioredoxin reductase · Topoisomerase IB

Introduction

Cisplatin and the second generation drugs carboplatin and oxaliplatin are among the most important chemotherapeutics used in the treatment of a variety of cancers. However, their side effects and the appearance of resistance to platinum antitumor drugs encourage the development of other metal-based compounds with distinct spectra of activities and lower systemic toxicity (Lippert 1999).

Currently, different studies report a variety of metal complexes with antineoplastic activity, such as palladium(II) (Garbutcheon-Singh et al. 2011), gallium(III) (Lessa et al. 2012a), gold(I, III) (Nobili et al. 2010), antimony(III), bismuth(III) (Tiekink 2002), ruthenium(II) (Bratsos et al. 2007), and copper(II) (Krajčiová et al. 2014) complexes. Since DNA is not the main target for many non-platinum metal-based drug candidates, determining the mechanism of action of these compounds is important to further understand their pharmacological activities.

Thioredoxin reductase (TrxR) is a selenoenzyme essential for antioxidant defense and redox homeostasis. TrxR is overexpressed in several tumor cell lineages. TrxR inactivation has been associated to

inhibition of cell growth/proliferation, cell cycle arrest and inhibition of apoptosis. Thus, TrxR may be considered as a promising target for anticancer therapy (Colotti et al. 2013; Powis et al. 2006). The literature reports that many gold(I, III) complexes are potent inhibitors of TrxR, suggesting that the cytotoxic activities of these complexes are mainly due to TrxR inhibition (Nobili et al. 2010; Ott 2009; Ott et al. 2009). Furthermore, TrxR inhibition has also been observed for complexes with metals different from gold, such as ruthenium(II, III) (Mura et al. 2007; Oehninger et al. 2013), tin(IV) (De Oliveira et al. 2013) and antimony(III) complexes (Parrilha et al. 2014).

Topoisomerase is another important enzymatic target for the development of new effective antitumor agents. This family of enzymes is able to control the topological state of DNA during various essential cellular processes as replication, transcription, recombination and chromosomal segregation (Thapa et al. 2015).

Topoisomerases are divided into two subfamilies: type I and type II topoisomerases, which cleave either one or two strands of the DNA helix, respectively, followed by repair and restoration of DNA integrity. In addition, each subfamily contains two different classes: type A enzymes form a covalent bond with the 5' end of DNA generated at the cleavage site, while type B form a covalent bond with the 3'-phosphate end of the cleaved strand (Castelli et al. 2013; Baikar and Malpathak 2010; Vieira et al. 2015).

Topoisomerase IB (Topo IB) is of great clinical interest and extensive data on the synthesis of Topo IB inhibitors have been reported in the literature (Meng et al. 2003; Baikar and Malpathak 2010; Castelli et al. 2011, 2013). Inhibition of topoisomerase activity has been observed for square planar metal complexes that exhibit cytotoxic activities, such as platinum(II), gold(III) and copper(II) complexes (Che and Siu 2010; Castelli et al. 2011; Zeglis et al. 2011).

Chalcones (1,3-diarylprop-2-en-1-ones) belong to the flavonoid family, in which two aryl rings are linked by an α,β -unsaturated ketone moiety. Their widespread distribution in comestible plants and the ease synthesis of these compounds encourage the investigation on the possible therapeutic applications of chalcone derivatives (Nowakowska 2007). In fact, this class of compounds has been reported to exhibit antimicrobial, anti-inflammatory, antileishmanial, anti-malarial, and antitumor activities (Dimmock et al. 1999; Go et al. 2005).

Thiosemicarbazones and their metal complexes also present a wide range of bioactivities as antiviral (Teitz et al. 1994), antimicrobial (Mendes et al. 2008), antiprotozoal (Merlino et al. 2010), and antitumor (Lessa et al. 2010) agents. The main target of $\alpha(N)$ -heterocyclic thiosemicarbazones is believed to be ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), an essential enzyme involved in the conversion of ribonucleotides into deoxyribonucleotides during DNA synthesis (Beraldo and Gambino 2004). However, inhibition of topoisomerase II by several families of thiosemicarbazones has been reported as well. In addition, upon coordination of a series of thiosemicarbazones to copper(II), inhibition of topoisomerase II α significantly increased (Zeglis et al. 2011).

Thiosemicarbazones possessing a variety of structural scaffolds have been investigated, but there are few reports in the literature on thiosemicarbazones containing the chalcone skeleton. In previous works we investigated gallium(III), zinc(II) (Da Silva et al. 2013a) and copper(II) (Da Silva et al. 2013b) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. We demonstrated that the copper(II) complexes exhibit significant cytotoxic activity against different human tumor cell lineages (Da Silva et al. 2013b).

In the context of a research program that aims to contribute to the discovery of new anticancer drug candidates, in the present work we prepared gold(III), platinum(II), and palladium(II) complexes with 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) (Fig. 1). The compounds were assayed for their cytotoxic activities against HL-60 and THP-1 leukemia and against MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells. As a preliminary investigation on the mode of action of these compounds, the ability of the most cytotoxic gold(III) complex to act as inhibitor of the enzymatic activities of TrxR and Topo IB was evaluated.

Materials and methods

Physical 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. 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 with a Bruker DPX-200 Avance (200 MHz) spectrometer using DMSO- d_6 or MeOD- d_4 as solvent and TMS as internal reference.

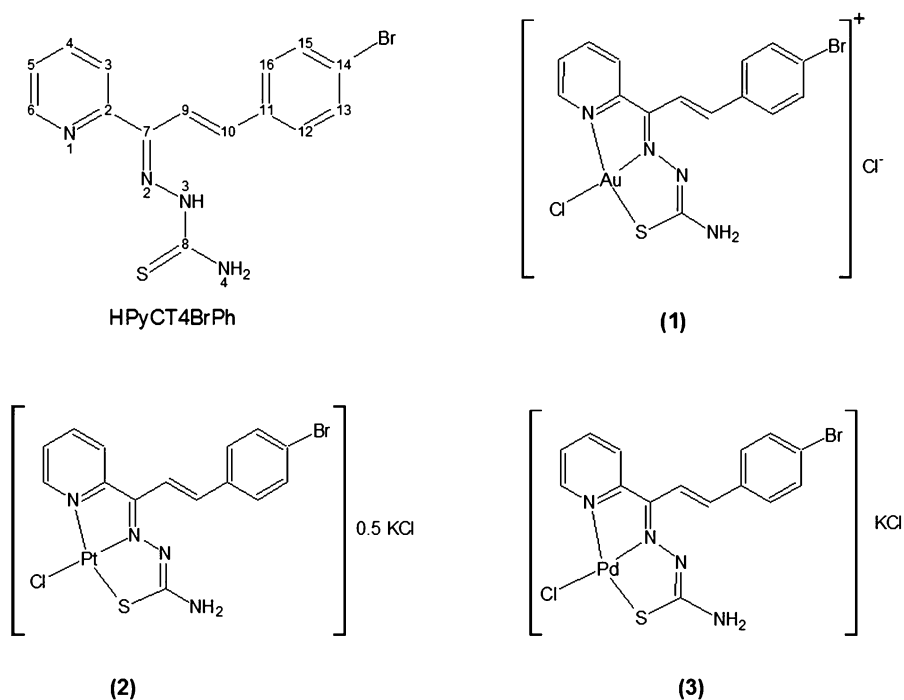
Syntheses of the compounds

3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) was prepared as previously described (Da Silva et al. 2013a). IR and NMR data were compatible with the proposed structure.

[(3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato)chlorogold(III)] chloride, [Au(PyCT4BrPh)Cl]Cl (1)

The gold(III) complex was obtained by mixing a 1:1 methanol/acetone solution of HPyCT4BrPh (1.0 mmol) with hydrogen tetrachloroaurate(III) (HAuCl₄·3H₂O) in 1:1 ligand-to-metal molar ratio at room

Fig. 1 Structure of 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) and its complexes [Au(PyCT4BrPh)Cl]Cl (1), [Pt(PyCT4BrPh)Cl]0.5KCl (2), [Pd(PyCT4BrPh)Cl]KCl (3)



temperature with stirring for 24 h. The resulting solid was filtered off, washed with methanol and acetone, and dried *in vacuo*.

Black solid. Anal. Calc. for C₁₅H₁₂AuBrCl₂N₄S: C, 28.68; H, 1.93; N, 8.92. Found: C, 28.70; H, 2.07; N, 8.81 %. FW: 628.12 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(C=N) 1600 m, ν(C-S) 722 w, ρ(py) 670 w. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMF): 71.8 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. ¹H NMR [200 MHz, MeOD-*d*₄, ppm]: 10.64 (1H, d, H6), 10.18–10.05 (4H, m, H3, H10, H-N4H), 9.57–9.50 (1H, m, H4), 9.34–9.12 (5H, m, H5, H12, H13, H15, H16), 8.99 (1H, d, H9). Melting point: 174–175 °C. Yield: 72 %.

[(3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one)thiosemicarbazonato]chloroplatinum(II)] hemipotassium chloride, [Pt(PyCT4BrPh)Cl]0.5KCl (2)

The platinum(II) complex was obtained by stirring under reflux a methanol solution of HPyCT4BrPh (1.0 mmol) with an aqueous solution of K₂PtCl₄ in equimolar amounts for 2 h. The resulting solid was filtered off, washed with methanol and diethyl ether, and dried *in vacuo*.

Brown solid. Anal. Calc. for C₁₅H₁₂BrCl_{1.5}N₄PtSK_{0.5}: C, 28.69; H, 1.93; N, 8.92. Found: C, 28.23;

H, 2.10; N, 8.72 %. FW: 628.06 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν(C=N) 1604 m, ν(C-S) 774 w, ρ(py) 668 w. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMF): 19.5 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm]: 8.85 (1H, d, H6), 8.36–8.28 (3H, m, H-N4H, H10), 8.17 (1H, t, H4), 8.11 (1H, d, H3), 7.70 (1H, t, H5), 7.72–7.64 (2H, m, H12, H16), 7.62 (2H, d, H13, H15). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm]: 147.9 (C2), 125.4 (C3), 140.8 (C4), 126.3 (C5), 146.4 (C6), 159.5 (C7=N), 186.0 (C8=S), 117.1 (C9), 140.6 (C10), 135.9 (C11), 129.7 (C12, C16), 131.8 (C13, C15), 122.8 (C14). Melting point: 225–227 °C. Yield: 81 %.

[(3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one)thiosemicarbazonato]chloropalladium(II)] potassium chloride, [Pd(PyCT4BrPh)Cl]KCl (3)

The palladium(II) complex was prepared by mixing HPyCT4BrPh in methanol with an aqueous solution of K₂PdCl₄ in equimolar amounts (1.0 mmol). The reaction mixture was kept under reflux for 2 h. The resulting solid was filtered off, washed with methanol and diethyl ether, and dried *in vacuo*.

Maroon solid. Anal. Calc. for C₁₅H₁₂BrCl₂N₄PdSK: C, 31.24; H, 2.10; N, 9.72. Found: C, 30.88; H, 2.32; N, 9.64 %. FW: 576.68 g mol⁻¹. IR (KBr,

cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1610 m, $\nu(\text{C}-\text{S})$ 776 w, $\rho(\text{py})$ 660 w. Molar conductivity ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DMF): $16.0 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. The main signals in ^1H NMR [400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm]: 8.62 (1H, d, H6), 8.22 (2H, d, H-N4H), 8.16 (3H, d, H3, H4, H10), 7.71 (2H, d, H12, H16), 7.64 (3H, d, H5, H13, H15), 7.21 (1H, d, H9). ^{13}C NMR [50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm]: 147.7 (C2), 124.9 (C3), 140.9 (C4), 125.6 (C5), 148.0 (C6), 158.2 (C7=N), 183.0 (C8=S), 116.0 (C9), 140.8 (C10), 135.6 (C11), 129.7 (C12, C16), 131.8 (C13, C15), 122.8 (C14). Melting point: dec. $>300^\circ\text{C}$. Yield: 72 %.

Cytotoxic activity

Cell lines

HL-60 (wild type human promyelocytic leukemia) and THP-1 (human monocytic cells derived from an acute monocytic leukemia patient) cell lines were kindly given by Dr. Gustavo Amarante-Mendes (São Paulo University, Brazil). MCF-7 and MDA-MB 231 (human breast carcinoma) cells were kindly given by Dr. Alfredo Goes (Federal University of Minas Gerais, Brazil). Vero cells (derived from the kidney of an African green monkey) were donated by Erna Kroon (Federal University of Minas Gerais, Brazil).

All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 100 U mL^{-1} penicillin and 100 mg mL^{-1} streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched with 2 mmol L^{-1} of L-glutamine and 10 % (for leukemic cells) or 5 % (for adherent cells) of fetal bovine serum. All cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5 % CO_2 and 95 % air. The media were changed twice weekly and they were regularly examined.

Evaluation of the cytotoxic effect against human tumor cell lines

Cells were seeded at densities/well of 50,000 for HL-60 and THP-1 cells. Adherent (MCF-7, MDA-MB 231 and Vero) cells were inoculated at 10,000 cells/well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37°C to allow adaptation of cells prior to the addition of the

test compounds. Freshly prepared solutions of the different compounds were screened at $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5 % CO_2 and 100 % relative humidity. Control groups included treatment with 0.5 % DMSO (dimethyl sulfoxide, negative control) and $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ of cisplatin or etoposide (positive control). Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT (see below). All compounds were dissolved in DMSO prior to dilution. Compounds that inhibited the proliferation in more than 50 % were selected for determination of the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). IC_{50} values were determined over a range of ten-fold concentrations ($100\text{--}0.001 \mu\text{mol L}^{-1}$). All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

In vitro cell viability MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) is a tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals mainly by mitochondrial succinate dehydrogenase and the color intensity of the formazan dye is correlated to the number of viable cells (Mosmann 1983).

Briefly, after 4 h of the end of incubation of cells with the different compounds, $20 \mu\text{L}$ of MTT solution (5 mg mL^{-1} in phosphate-buffered saline) were added to each well, the supernatant was removed and $200 \mu\text{L}$ of 0.04 mol L^{-1} HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 595 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, comparing with 0.5 % DMSO control and were calculated as follows: viability (%) = $(\text{mean OD treated} - \text{mean OD background}) / (\text{mean OD untreated cultured, i.e. 0.5 \% DMSO} - \text{mean OD blank wells}) \times 100$. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative in relation to the control (Ulukaya et al. 2004).

Inhibition of thioredoxin reductase (TrxR) and topoisomerase IB (Topo IB) enzymatic activities

Electronic spectra recorded with time (data not shown) indicated that complex **(1)** is stable in buffer/5 % DMF pH = 7.4 or buffer/5 % DMSO pH = 7.4 under the experimental conditions employed in the enzyme inhibition assays. The presence of absorptions in the 450–600 nm range, attributable to S → Au(III) and N → Au(III) ligand-to-metal charge transfer transitions (Lessa et al. 2012b), suggested that reduction of the metal did not take place.

Inhibition of thioredoxin reductase (TrxR) activity

Rat liver TrxR (Sigma) was used to determine TrxR inhibition by the compounds. The studies were carried out by means of the dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) reduction assay. This assay makes use of the fact that TrxR reduces the disulfide bonds of DTNB with formation of 5-thionitrobenzoic acid (TNB), which can be detected photometrically.

The assay was performed according to the manufacturer's instructions (Sigma product information sheet T9698) and to Ott et al. (2009) with appropriate modifications. First, the experiments were performed at 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. After, in order to determine the concentration of the compounds able to inhibit 50 % of the enzymatic activity (IC_{50}), new experiments were performed for each selected compound at 13 different concentrations in the 0.01–50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ range.

Initially, the TrxR rat liver solution was diluted with potassium phosphate buffer, pH 7.0. To 20 μL aliquots of this solution (each containing approximately 0.12 units of the enzyme), 20 μL of 5 % DMF in potassium phosphate buffer pH 7.0, containing the compounds in 13 different concentrations in the 0.01–50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ range or vehicle without compound (control) were added. The resulting solutions were incubated for 1 h at 37 °C with moderate shaking. The solutions were then transferred quantitatively to 96-well plates, and to each well 200 μL of reaction mixture (10 mL of reaction mixture consisted of 1.0 mL of 1.0 mol L^{-1} potassium phosphate buffer, pH 7.0; 0.20 mL of 500 mmol L^{-1} EDTA solution, pH 7.5; 0.80 mL of 63 mmol L^{-1} DTNB in ethanol; 0.10 mL of 20 mg mL^{-1} bovine serum albumin;

0.05 mL of 48 mmol L^{-1} NADPH and 7.85 mL of water) were added. To correct for non-enzymatic product formation, 40 μL of 1.0 mol L^{-1} potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 200 μL of reaction mixture were processed simultaneously (blank value). After proper mixing, the formation of TNB was monitored in a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan Go Spectrophotometer) at 412 nm for 10 min. The absorbance of the blank was subtracted from that of the control and treated wells. The enzymatic activities were calculated as the maximum absorbance produced in 10 min in each well. The experiments were performed in triplicate.

Inhibition of topoisomerase IB activity

Human topoisomerase IB was expressed and purified as described previously (Chillemi et al. 2005). Topo IB enzyme was incubated in 30 μL of reaction volume containing 0.5 μg of negatively supercoiled pBlue-Script KSII(+) DNA plasmid in Reaction Buffer (20 mmol L^{-1} Tris-HCl, 0.1 mmol L^{-1} Na_2EDTA , 10 mmol L^{-1} MgCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ acetylated BSA and 150 mmol L^{-1} KCl, pH 7.5). To assess the effects of the compounds under study on enzyme activity, different concentrations of the compounds were added. Reactions were stopped with a final concentration of 0.5 % SDS after 1 h at 37 °C. The samples were electrophoresed in a horizontal 1 % agarose gel in 50 mmol L^{-1} Tris, 45 mmol L^{-1} boric acid, 1 mmol L^{-1} EDTA). The gel was stained with ethidium bromide (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), de-stained with water and photographed under UV illumination. Where indicated, enzyme and inhibitor were pre-incubated at 37 °C for 1 min, prior to the addition of the substrate. The mixture was then incubated at 37 °C for 15 min.

Results and discussion

Formation of the complexes

Microanalyses and molar conductivity data were compatible with the formation of $[\text{Au}(\text{PyCT4BrPh})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{Pt}(\text{PyCT4BrPh})\text{Cl}]\text{0.5KCl}$ (**2**), and $[\text{Pd}(\text{PyCT4BrPh})\text{Cl}]\text{KCl}$ (**3**). The presence of KCl in complexes (**2**) and (**3**) could have arisen from the precursor salts, contributing to the molar conductivity.

In fact, molar conductivity data suggest that **2** and **3** are weak electrolytes. Similar behavior was previously reported for platinum(II, IV) complexes with clioquinol (Ferraz et al. 2013a) and for a palladium(II) complex with D-penicillamine (Cervantes et al. 1998).

In complex (**1**) one anionic thiosemicarbazone ligand and one chloride ion are attached to the gold(III) center, and a chloride acts as counter-ion. In complexes [Pt(PyCT4BrPh)Cl]0.5KCl (**2**) and [Pd(PyCT4BrPh)Cl]KCl (**3**) one anionic thiosemicarbazone ligand is attached to the metal center together with a chloride ion. In addition, 0.5 KCl is present in complex (**2**) and 1.0 KCl in complex (**3**).

Spectroscopic characterization

The vibration attributed to $\nu(\text{C}=\text{N})$ at 1560 cm^{-1} in the infrared spectrum of HPyCT4BrPh shifts to $1610\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of its complexes, in agreement with coordination via the azomethine nitrogen (Ferraz et al. 2011, 2013b).

The $\nu(\text{C}=\text{S})$ absorption observed at 780 cm^{-1} in the spectrum of the free thiosemicarbazone shifts to $776\text{--}722\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of the complexes, indicating coordination of the sulfur (Lessa et al. 2011; Ferraz et al. 2009). In addition, the vibration attributed to $\nu(\text{N}\text{--}\text{H})$ in the free thiosemicarbazone disappears in the spectra of the complexes indicating deprotonation (Ferraz et al. 2012). The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 554 cm^{-1} in the spectrum of the uncomplexed thiosemicarbazone shifts to $670\text{--}660\text{ cm}^{-1}$ in the complexes, suggesting coordination of the heteroaromatic nitrogen (Lessa et al. 2011; Ferraz et al. 2013b). Hence, the infrared data suggest that in the complexes the thiosemicarbazone is attached to the metal center through the $\text{N}_{\text{py}}\text{--}\text{N}\text{--}\text{S}$ chelating system (see Fig. 1).

Although the thiosemicarbazone and its complexes were soluble in DMSO- d_6 , at high concentration the gold(III) complex interacted with the solvent. Hence, the ^1H NMR spectrum of **1** was recorded in methanol- d_4 . For complexes (**2**) and (**3**), the NMR spectra were recorded in DMSO- d_6 . The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. We did not obtain the ^{13}C NMR spectrum of **1** due to its low solubility in methanol- d_4 . For **2** and **3**, the C-atom type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT-135) experiments. The assignments of the

protonated carbons were accomplished by 2D heteronuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

Immediately after dissolution, the signals of all hydrogen and carbon atoms are duplicated in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the free thiosemicarbazone, indicating the presence of two isomers in DMSO- d_6 . The signals at 13.07 and 11.44 ppm in the ^1H NMR spectrum were attributed to N3-H of the *Z* and *E* isomers, respectively. In the first, N3-H is hydrogen bonded to the heteroaromatic nitrogen while in the second N3-H is hydrogen bonded to the solvent (Da Silva et al. 2013a).

In the ^1H NMR spectra of complexes (**1**–**3**), only one signal was observed for each hydrogen, suggesting the presence of only the *E* configurational isomer in solution. The absence of the N3-H signal in the spectra of complexes (**2**) and (**3**) indicates coordination of an anionic thiosemicarbazone. In addition, the signals of all hydrogens undergo significant shifts upon coordination. Similarly, the signals of C7=N, C8=S and the pyridine carbons shift significantly, in agreement with coordination through the $\text{N}_{\text{py}}\text{--}\text{N}\text{--}\text{S}$ system.

Cytotoxic activity

The cytotoxic activities of the compounds were assayed on HL-60 and THP-1 leukemia cells, and on MDA-MB 231 and MCF-7 solid tumor cells. In addition, cytotoxicity was evaluated against Vero, as a representative of non-malignant cells. Negative control was taken as 100 % survival.

First, the percentage of cell survival in the presence of the studied compounds at $1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ was assayed (data not shown). Results indicated that complex (**2**) and the metal precursors used in the syntheses of the complexes were not significantly active against the tested malignant cells. The obtained preliminary results of cell survival stimulated determining the concentration of HPyCT4BrPh and complexes (**1**) and (**3**) able to kill 50 % of the tumor cells (IC_{50}). IC_{50} values for the platinum complex (**2**) were not determined due to its low cytotoxic activity.

The determined IC_{50} values are shown in Table 1. Coordination to gold(III) resulted in enhanced cytotoxic activity against THP-1, MDA-MB 231 and MCF-7 cells. Complex (**1**) was 3-fold more active than HPyCT4BrPh against MCF-7 cells. In addition,

Table 1 Cytotoxic activity (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$) of HPyCT4BrPh and its gold(III) (**1**) and palladium(II) (**3**) complexes on HL-60, THP-1, MDA-MB 231, MCF-7 and Vero cell lines

Compound	IC_{50} values				
	HL60	THP-1	MDA-MB 231	MCF-7	Vero
HPyCT4BrPh	0.04 (± 0.002)	1.27 (± 0.32)	0.25 (± 0.11)	1.23 (± 0.25)	>10
1	0.26 (± 0.20)	0.62 (± 0.49)	0.09 (± 0.05)	0.42 (± 0.01)	>1
3	>1	>1	>1	>1	>1
Cisplatin	0.023 (± 0.014)	0.015 (± 0.011)	>100	>100	13.045 (± 0.629)
Etoposide	0.855 (± 0.389)	2.751 (± 1.062)	>100	>100	>100

HPyCT4BrPh and its gold(III) complex (**1**) were less cytotoxic to Vero than to the assayed tumor cell lineages.

Studies on the mechanisms of action of complex (**1**)

As a preliminary investigation into the mode of action of the compounds under study, the effects of HPyCT4BrPh and its gold(III) complex (**1**) on the enzymatic activities of TrxR and Topo IB were evaluated.

Inhibition of thioredoxin reductase (TrxR) activity

Inhibition of TrxR activity was considered as a potential mechanism for the anti-proliferative activity of complex (**1**). The gold(I) containing anti-arthritis drug, triethylphosphinegold(I)tetraacetylthioglucose, “auranofin”, was used as control due to its well known ability to inhibit TrxR (Andrade and Reed 2015). Thus, the in vitro inhibitory activities of HPyCT4BrPh, **1**, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and auranofin were evaluated using isolated rat liver TrxR by means of the DTNB reduction assay.

Initially, the ability of the selected compounds to inhibit TrxR activity was investigated at $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. HPyCT4BrPh was unable to inhibit the enzymatic activity in the assayed concentration. Thus, the free thiosemicarbazone, although being cytotoxic against the tumor cell lineages, did not show any inhibitory effect of TrxR activity. In fact, the main target of thiosemicarbazones is believed to be RDR (Beraldo and Gambino 2004). Complex (**1**) inhibited 77.9 %, while $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and auranofin inhibited 97.5 and 95.2 % of TrxR activity, respectively. Similarly, in a

previous work we demonstrated that $[\text{Au}(\text{H}_{\text{py}}2\text{-Ac}4\text{mT})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ ($\text{H}_{\text{py}}4\text{Ac}4\text{mT}$ stands for the thiosemicarbazone protonated at the pyridine nitrogen), a gold(III) complex with 2-acetylpyridine-4-*meta*-tolyl thiosemicarbazone inhibited 75 % of TrxR activity at $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Ferraz et al. 2013b).

The obtained preliminary results on TrxR inhibition stimulated the determination of the concentration of **1** and $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ which decreases the enzymatic activity by 50 % in relation to the control (IC_{50}). Complex (**1**) inhibited the enzyme activity with $IC_{50} = 5.55 \mu\text{mol L}^{-1}$ (95 % confidence interval = $5.11\text{--}6.03 \mu\text{mol L}^{-1}$), suggesting TrxR as a possible biological target for this compound. In addition, auranofin ($IC_{50} = 0.30 \mu\text{mol L}^{-1}$; 95 % confidence interval = $0.27\text{--}0.32 \mu\text{mol L}^{-1}$) and $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($IC_{50} = 0.62 \mu\text{mol L}^{-1}$; 95 % confidence interval = $0.59\text{--}0.65 \mu\text{mol L}^{-1}$) also strongly inhibited the enzymatic activity, indicating that the inhibitory effect of **1** on TrxR may be related to the presence of gold.

In spite of the fact that $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ strongly inhibited TrxR activity, it proved to be devoid of any cytotoxic effect against the cell lines under study. The absence of cytotoxic activity of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ may be due to its hydrophilic character, which probably hinders its passage through the cell membrane. In previous works we demonstrated that gold(I) and gold(III) complexes with $\alpha(N)$ -heterocyclic thiosemicarbazones (Lessa et al. 2011; Ferraz et al. 2013b) and with *bis*(thiosemicarbazones) (Lessa et al. 2012b) were potent inhibitors of TrxR activity. As previously suggested, the thiosemicarbazone, besides its own cytotoxic effect, probably acts as a carrier of gold into the cell.

The affinity of complex (**1**) for TrxR suggests metal binding to a selenol residue in the active site of the

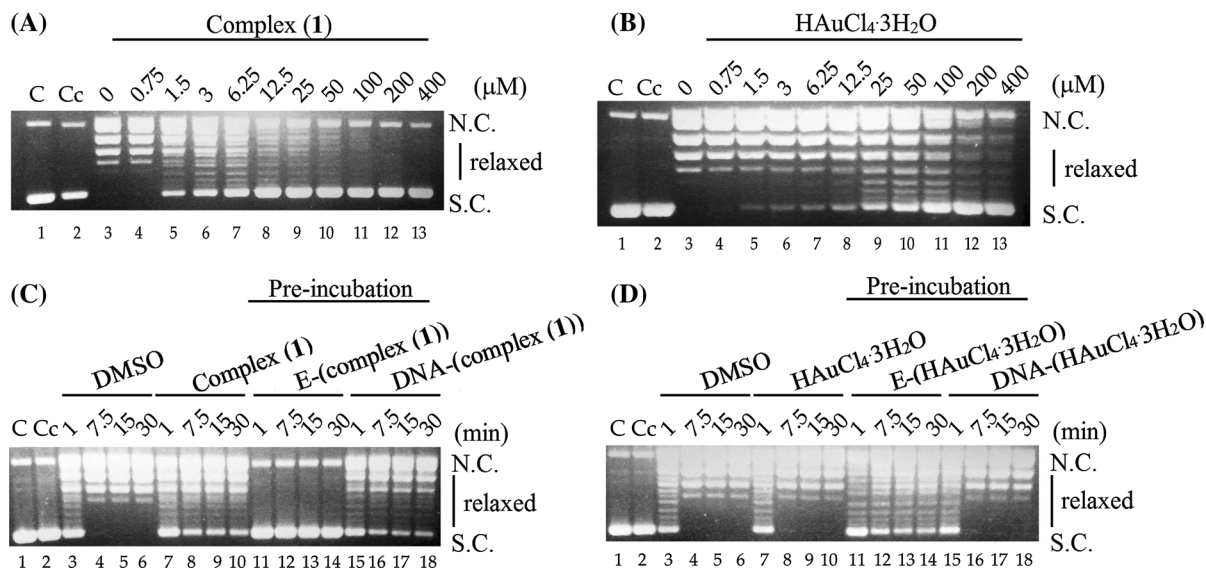


Fig. 2 Relaxation of supercoiled DNA by human topoisomerase IB in the presence of increasing concentrations of complex **(1)** (A) and $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (B). Lane 1, supercoiled pBlueScript KSII(+) DNA plasmid. Lane 2, DNA plasmid in the presence of an excess of complex **(1)** or $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. (C) Relaxation activity of Topo IB in the presence of: DMSO (lanes 3–6), $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ complex **(1)** (lanes 7–10), after 5 min enzyme-complex **(1)** pre-incubation, before substrate addition (lanes 11–14) and after 5 min DNA-complex **(1)**, before enzyme addition (lanes 15–18). Lane 1, supercoiled pBlueScript

KSII(+) DNA plasmid. Lane 2, DNA plasmid in the presence of $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ complex **(1)**. (D) Relaxation activity of Topo IB in the presence of: DMSO (lanes 3–6), $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (lanes 7–10), after 5 min enzyme- $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pre-incubation, before substrate addition (lanes 11–14) and after 5 min DNA- $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, before enzyme addition (lanes 15–18). Lane 1, supercoiled pBlueScript KSII(+) DNA plasmid. Lane 2, DNA plasmid in the presence of $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

enzyme. Hence, TrxR inhibition is possibly a contributing factor to its mode of action, as previously proposed for gold(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones (Parrilha et al. 2014).

Inhibition of topoisomerase IB (Topo IB) activity

Topo IB is a validated target for cancer chemotherapy. The effect of complex **(1)** on human topoisomerase IB was studied by a relaxation assay that permits to evaluate the potential inhibitory effect of the compounds following the differences in electrophoretic mobility of supercoiled DNA and its partially relaxed forms produced by the enzyme activity (Fig. 2A compare lanes 1 and 3).

Complex **(1)** inhibits Topo IB in a dose depended manner, starting from $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ concentration. The effect is completed at around $50\text{--}100 \mu\text{mol L}^{-1}$, as it can be appreciated in Fig. 2A from the intensity of the band corresponding to supercoiled DNA and from

the absence of bands corresponding to the topoisomers. The inhibitory effect of **1** is improved when the complex is pre-incubated with the enzyme for 5 min before DNA addition. In this condition, a concentration of $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ is enough to completely inhibit the enzymatic activity (Fig. 2C). Hence, Topo IB inhibition could take part in the mode of action of complex **(1)**.

It is noteworthy that $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ alone was able to inhibit Topo IB activity but in this case inhibition was never completed (Fig. 2B). Pre-incubation of the enzyme with the gold precursor before DNA addition strengthens the effect, suggesting that gold interacts somewhere on the enzyme, reducing its ability to relax DNA (Fig. 2D).

The free thiosemicarbazone was unable to inhibit the enzyme (data not shown). Comparing the experiments of dose dependent Topo IB inhibition performed in the presence of complex **(1)** and in the presence of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ we can state that gold(III) coordination to the thiosemicarbazone ligand improved the

inhibitory effect of gold about 8–16 times (Fig. 2 compare A, B).

Conclusions

Coordination of HPyCT4BrPh to gold(III) in complex (**1**) resulted in higher cytotoxic activity against all studied cell lineages except HL-60 cells.

Since complex (**1**), auranofin and $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ inhibited the enzymatic activity of TrxR, the inhibitory effect of **1** may be related to the presence of gold. However, unlike HAuCl_4 , **1** not only inhibited TrxR activity but also showed strong cytotoxic effect, indicating that the thiosemicarbazone probably acts as a carrier of gold into the cell, as previously suggested by us.

While the free thiosemicarbazone was unable to inhibit the enzymatic activity of Topo IB, complex (**1**) inhibited Topo IB activity in a dose depended manner. $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ alone was also able to inhibit Topo IB activity. Pre-incubation of the enzyme with $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ before DNA addition strengthens the effect, suggesting that gold interacts somewhere on the enzyme, reducing its ability to relax DNA. Upon coordination of gold(III) to the thiosemicarbazone the inhibitory effect of gold significantly increased.

We demonstrated that TrxR and Topo IB inhibition could take part in the mechanism of cytotoxic action of **1** but not in that of the free thiosemicarbazone. Gold(III) probably binds to a selenol residue in the active site of TrxR and probably interacts somewhere on Topo IB. In both cases, inhibition of the enzymatic activity was due to the presence of gold(III) but the thiosemicarbazone plays an important role, probably as a carrier of the metal.

The main cellular target of platinum-based antitumor drugs is DNA. Although platinum(II) and gold(-III) complexes are isoelectronic and isostructural, both presenting square planar geometry, their mechanisms of anti-proliferative activity are substantially distinct. The present work represents an important contribution to the understanding of the cellular targets and mode of cytotoxic action of gold(III) complexes.

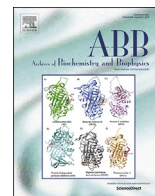
Acknowledgments The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) and CAPES/PNPD.

References

- Andrade RM, Reed SL (2015) New drug target in protozoan parasites: the role of thioredoxin reductase. *Front Microbiol* 6:1–7. doi:10.3389/fmicb.2015.00975
- Baikar S, Malpathak N (2010) Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: a new era towards designing of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev* 4:12–26. doi:10.4103/0973-7847.65320
- Beraldo H, Gambino D (2004) The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev Med Chem* 4:31–39. doi:10.2174/1389557043487484 (and references therein)
- Bratsos I, Jedner S, Gianferrara T, Alessio E (2007) Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. *Chimia* 61:692–697. doi:10.2533/chimia.2007.692
- Castelli S, Vassallo O, Katkar P, Che CM, Sun RWY, Desideri A (2011) Inhibition of human DNA topoisomerase IB by a cyclometalated gold III compound: analysis on the different steps of the enzyme catalytic cycle. *Arch Biochem Biophys* 516:108–112. doi:10.1016/j.abb.2011.10.008
- Castelli S, Katkar P, Vassallo O, Falconi M, Linder S, Desideri A (2013) A natural anticancer agent thaspine targets human topoisomerase IB. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 13:356–363. doi:10.2174/187152013804711128
- Cervantes G, Moreno V, Molins E, Quirós M (1998) Pd(II) and Pt(II) D-penicillamine complexes. Crystal structure of a tridentate D-penicillamine cluster of Pd(II). *Polyhedron* 17:3343–3350. doi:10.1016/S0277-5387(98)00114-4
- Che CM, Siu FM (2010) Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. *Curr Opin Chem Biol* 14:255–261. doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.015
- Chillemi G, Fiorani P, Castelli S, Bruselles A, Benedetti P, Desideri A (2005) Effect on DNA relaxation of the single Thr718Ala mutation in human topoisomerase I: a functional and molecular dynamics study. *Nucleic Acids Res* 33:3339–3350. doi:10.1093/nar/gki642
- Colotti G, Ilari A, Boffi A, Morea V (2013) Metals and metal derivatives in medicine. *Mini-Rev Med Chem* 13:211–221. doi:10.2174/138955713804805238
- Da Silva JG, Perdigão CCH, Speziali NL, Beraldo H (2013a) Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity. *J Coord Chem* 66:385–401. doi:10.1080/00958972.2012.757762
- Da Silva JG, Despaigne AAR, Louro SRW, Bandeira CC, Souza-Fagundes EM, Beraldo H (2013b) Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. *Eur J Med Chem* 65:415–426. doi:10.1016/j.ejmech.2013.04.036
- De Oliveira KN, Andermark V, von Grafenstein S, Onambele LA, Dahl G, Rubbiani R, Wolber G, Gabbiani C, Messori L, Prokop A, Ott I (2013) Butyltin(IV) benzoates: inhibition of thioredoxin reductase, tumor cell growth inhibition, and interactions with proteins. *ChemMedChem* 8:256–264. doi:10.1002/cmdc.201200505
- Dimmock JR, Elias DW, Beazely MA, Kandepu NM (1999) Bioactivities of chalcones. *Curr Med Chem* 6:1125–1149

- Ferraz KSO, Ferandes L, Carrilho D, Pinto MCX, Leite MF, Souza-Fagundes EM, Speziali NL, Mendes IC, Beraldo H (2009) 2-Benzoylpyridine-*N*(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. *Bioorg Med Chem* 17:7138–7144. doi:10.1016/j.bmc.2009.08.063
- Ferraz KOS, Cardoso GMM, Bertollo CM, Souza-Fagundes EM, Speziali N, Zani CL, Mendes IC, Gomes MA, Beraldo H (2011) *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and platinum(II) complexes: cytotoxicity against human solid tumor cells. *Polyhedron* 30:315–321. doi:10.1016/j.poly.2010.10.014
- Ferraz KSO, Silva NF, Da Silva JG, Speziali NL, Mendes IC, Beraldo H (2012) Structural studies on acetophenone- and benzophenone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) complexes. *J Mol Struct* 1008:102–107. doi:10.1016/j.molstruc.2011.11.035
- Ferraz KSO, Reis DC, Da Silva JG, Souza-Fagundes EM, Baran EJ, Beraldo H (2013a) Investigation on the bioactivities of clioquinol and its bismuth(III) and platinum(II, IV) complexes. *Polyhedron* 63:28–35. doi:10.1016/j.poly.2013.07.008
- Ferraz KSO, Da Silva JG, Costa FM, Mendes BM, Rodrigues BL, dos Santos RG, Beraldo H (2013b) *N*(4)-Tolyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazones and their platinum(II, IV) and gold(III) complexes: cytotoxicity against human glioma cells and studies on the mode of action. *Biometals* 26:677–691. doi:10.1007/s10534-013-9639-x
- Garbutcheon-Singh KB, Grant MP, Harper BW, Krause-Heuer AM, Manohar M, Orkey N, Aldrich-Wright JR (2011) Transition metal based anticancer drugs. *Curr Top Med Chem* 11:521–542. doi:10.2174/156802611794785226
- Go ML, Wu X, Liu XL (2005) Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem* 12:483–499. doi:10.2174/0929867053363153
- Krajčiová D, Melník M, Havránek E, Forgáčsová A, Mikuš P (2014) Copper compounds in nuclear medicine and oncology. *J Coord Chem* 67:1493–1519. doi:10.1080/00958972.2014.915966
- Lessa JA, Mendes IC, da Silva PRO, Soares MA, dos Santos RG, Speziali NL, Romeiro NC, Barreiro EJ, Beraldo H (2010) 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *Eur J Med Chem* 45:5671–5677. doi:10.1016/j.ejmech.2010.09.021
- Lessa JA, Guerra JC, de Miranda LF, Romeiro CFD, Da Silva JG, Mendes IC, Speziali NL, Souza-Fagundes EM, Beraldo H (2011) Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *J Inorg Biochem* 105:1729–1739. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.09.008
- Lessa JA, Ferraz KSO, Guerra JC, de Miranda LF, Romeiro CFD, Souza-Fagundes EM, Barbeira PJS, Beraldo H (2012a) Spectroscopic and electrochemical characterization of gold(I) and gold(III) complexes with glyoxaldehyde *bis*(thiosemicarbazones): cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *Biometals* 25:587–598. doi:10.1007/s10534-012-9547-5
- Lessa JA, Parrilha GL, Beraldo H (2012b) Gallium complexes as new promising metallodrug candidates. *Inorg Chim Acta* 393:53–63. doi:10.1016/j.ica.2012.06.003 (and references therein)
- Lippert B (1999) *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*. Wiley, Weinheim
- Mendes IC, Moreira JP, Ardisson JD, dos Santos RG, da Silva PRO, Garcia I, Castiñeiras A, Beraldo H (2008) Organotin(IV) complexes of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects. *Eur J Med Chem* 43:1454–1461. doi:10.1016/j.ejmech.2007.09.016
- Meng LH, Liao ZY, Pommier Y (2003) Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 3:305–320. doi:10.2174/1568026033452546
- Merlino A, Benitez D, Chavez S, da Cunha J, Hernández P, Tinoco LW, Campillo NE, Páez JA, Cerecetto H, González M (2010) Development of second generation amidinohydrazones, thio- and semicarbazones as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors bearing benzofuroxan and benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds. *Med Chem Commun* 1:216–228. doi:10.1039/c0md000085
- Mosmann Y (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Mura P, Camalli M, Bindoli A, Sorrentino F, Casini A, Gabbiani C, Corsini M, Zanella P, Rigobello MP, Messori L (2007) Activity of rat cytosolic thioredoxin reductase is strongly decreased by *trans*-[bis(2-amino-5-methylthiazole)tetra-chlororuthenate(III)]: first report of relevant thioredoxin reductase inhibition for a ruthenium compound. *J Med Chem* 50:5871–5874. doi:10.1021/jm0708578
- Nobili S, Mini E, Landini I, Gabbiani C, Casini A, Messori L (2010) Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med Res Rev* 30:550–580. doi:10.1002/med.20168
- Nowakowska Z (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem* 42:125–137. doi:10.1016/j.ejmech.2006.09.019
- Oehninger L, Stefanopoulou M, Alborzinia H, Schur J, Ludewig S, Namikawa K, Muñoz-Castro A, Köster RW, Baumann K, Wölfl S, Sheldrick WS, Ott I (2013) Evaluation of arene ruthenium(II) *N*-heterocyclic carbene complexes as organometallics interacting with thiol and selenol containing biomolecules. *Dalton Trans* 42:1657–1666. doi:10.1039/c2dt32319b
- Ott I (2009) On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord Chem Rev* 253:1670–1681. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.019
- Ott I, Qian X, Xu Y, Vlecken DHW, Marques II, Kubutat D, Will J, Sheldrick WS, Jesse P, Prokop A, Bagowski CP (2009) A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. *J Med Chem* 52:763–770. doi:10.1021/jm8012135
- Parrilha GL, Ferraz KSO, Lessa JA, de Oliveira KN, Rodrigues BL, Ramos JP, Souza-Fagundes EM, Ott I, Beraldo H (2014) Metal complexes with 2-acetylpyridine-*N*(4)-ortho-chlorophenylthiosemicarbazone: cytotoxicity and effect on the enzymatic activity of thioredoxin reductase and glutathione reductase. *Eur J Med Chem* 84:537–544. doi:10.1016/j.ejmech.2014.07.055

- Powis G, Wipf P, Lynch SM, Birmingham A, Kirkpatrick DL (2006) Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase. *Mol Cancer Ther* 5:630–636. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-05-0487](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0487)
- Teitz Y, Ronen D, Vansover A, Stematsky T, Riggs JL (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus by *N*-methylisatin- β 4': β 4'-diethylthiosemicarbazone and *N*-allylisatin- β 4':4'-diallylthiosemicarbazone. *Antiviral Res* 24:305–314. doi:[10.1016/0166-3542\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90077-9)
- Thapa P, Jun KY, Kadayat TM, Park C, Zheng Z, Magar TBT, Bist G, Shrestha A, Na Y, Kwon Y, Lee ES (2015) Design and synthesis of conformationally constrained hydroxylated 4-phenyl-2-aryl chromenopyridines as novel and selective topoisomerase II-targeted antiproliferative agents. *Bioorg Med Chem* 23:6454–6466. doi:[10.1016/j.bmc.2015.08.018](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.018)
- Tiekink ERT (2002) Antimony and bismuth compounds in oncology. *Crit Rev Oncol Hemat* 42:217–224. doi:[10.1016/S1040-8428\(01\)00217-7](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00217-7)
- Ulukaya E, Colakogullari M, Wood EJ (2004) Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy* 50:43–50. doi:[10.1159/000077285](https://doi.org/10.1159/000077285)
- Vieira S, Castelli S, Desideri A (2015) Importance of a stable topoisomerase IB clamping for an efficient DNA processing: effect of the Lys³⁶⁹Glu mutation. *Int J Biol Macromol* 81:76–82. doi:[10.1016/j.ijbiomac.2015.07.044](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.044)
- Zeglis BM, Divilov V, Lewis JS (2011) Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N⁴-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *J Med Chem* 54:2391–2398. doi:[10.1021/jm101532u](https://doi.org/10.1021/jm101532u)



Human topoisomerase IB is a target of a thiosemicarbazone copper(II) complex



Venn Vutey^{a,1}, Silvia Castelli^{a,1}, Ilda D'Annessa^a, Luciana B.P. Sâmia^b,
Elaine M. Souza-Fagundes^b, Heloisa Beraldo^b, Alessandro Desideri^{a,*}

^a Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2016

Received in revised form

30 June 2016

Accepted 12 July 2016

Available online 16 July 2016

Keywords:

Human DNA topoisomerase IB

Thiosemicarbazone

Copper(II) complex

Catalytic inhibitor

Molecular docking

Cytotoxicity

ABSTRACT

The human topoisomerase IB inhibition and the antiproliferative activity of 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone HPyCT4BrPh alone and its copper(II) complex [Cu(PyCT4BrPh)Cl] was investigated. [Cu(PyCT4BrPh)Cl] inhibits both the DNA cleavage and religation step of the enzyme, whilst the ligand alone does not display any effect. In addition we show that coordination to copper(II) improves the cytotoxicity of HPyCT4BrPh against THP-1 leukemia and MCF-7 breast cancer cells. The data indicate that the copper(II) thiosemicarbazone complex may hit human topoisomerase IB and that metal coordination can be useful to improve cytotoxicity of this versatile class of compounds.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Human topoisomerase IB (topo IB) is an essential enzyme, which controls the topological state of DNA during replication and transcription processes [1–3]. It has a considerable medical interest because it is the sole cellular target of camptothecins (CPT), a family of compounds used in cancer therapy [4,5], with topotecan and irinotecan approved for clinical use by the FDA [6]. CPT stabilizes the covalent intermediate enzyme-DNA, transforming topo IB in a poison for the cell [7,8]. Other bioactive compounds are able to inhibit topo IB, affecting binding to DNA and/or the chemistry of cleavage reaction [9–11].

Thiosemicarbazones and their metal complexes are a class of compounds exhibiting a wide pharmacological profile. α (N)-heterocyclic thiosemicarbazones have been shown to present anti-cancer activity [12]. 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde

thiosemicarbazone (“Triapine”) was found to be effective against leukemia [13] and it has been evaluated in several clinical phase I and II trials [14]. The proposed mode of action of these compounds involves inhibition of ribonucleotide reductase, an enzyme that catalyzes the reduction of ribonucleotides to the corresponding 2'-deoxyribonucleotides during DNA synthesis. Thiosemicarbazones have been suggested to form an iron(III) complex within the cell, which is reduced to the corresponding iron(II) complex. The iron(II) complex may react with oxygen leading to the production of reactive oxygen species (ROS) able to inactivate the tyrosyl free radical that is present in the enzyme structure [15]. Direct reduction of the radical by the iron(II) complex has also been proposed [16].

Another established target for some α (N)-heterocyclic thiosemicarbazones is topoisomerase II α (Topo II α), an enzyme regulating DNA topology during cell division [17]. A series of α (N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones proved to have strong affinity for the enzyme, and their anti-proliferative activity was found to correlate with Topo II α inhibition [18]. In addition, a family of 2-formylpyridine- and 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones showed Topo II α inhibition activity, which increased upon complexation with copper(II) with formation of square-planar complexes [19]. As far as topoisomerase I is

Abbreviations: topo IB, human topoisomerase IB; complex (1), [Cu(PyCT4BrPh)Cl]; CPT, camptothecin.

* Corresponding author. Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Via Della Ricerca Scientifica, I-00133, Rome, Italy.

E-mail address: desideri@uniroma2.it (A. Desideri).

¹ Vutey V. and Castelli S. equally contributed to the study.

concerned, enzyme inhibition was reported for zinc(II) complexes with polyhydroxobenzaldehyde derivatives [20].

Chalcones (1,3-diaryl-2-propen-1-ones) are a class of flavonoid natural products consisting of two aryl rings linked by an α,β -unsaturated ketone moiety, with widespread distribution in plants. These compounds possess a variety of biological activities as anti-oxidant, cytotoxic, anticancer, antimicrobial, antiprotozoal and anti-inflammatory agents [21]. Thiosemicarbazones with a great diversity of structural scaffolds have been investigated but there are not many reports in the literature on chalcone-derived thiosemicarbazones. In previous works a family of chalcone-based thiosemicarbazones and their zinc(II), gallium(III) [22] and copper(II) complexes were prepared [23] and it was shown that coordination to copper(II) significantly increased the cytotoxicity against Jurkat leukemia, against MDA-MB 231 (human breast carcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) cancer cells [23].

In the present work, in order to further test the potentiality of chalcone-derived thiosemicarbazones as potential anticancer drug, the interactions of 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) and its copper(II) complex [Cu(PyCT4BrPh)Cl] (Fig. 1), hereafter called complex (1) with topoisomerase IB were investigated. An evaluation of the cytotoxic effects of both compounds on THP-1 leukemia and MCF-7 breast cancer cells was performed as well. The results indicate that topoisomerase IB becomes the target of 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone HPyCT4BrPh once it is coordinated to copper(II). In detail, complex (1) inhibits the enzyme in a dose dependent manner, acting primarily on the cleavage step of the topo IB catalytic cycle, although the religation rate is also perturbed. Pre-incubation of the enzyme-complex (1) before DNA addition improves the inhibitory effect of the thiosemicarbazone complex indicating that it acts as a topoisomerase inhibitor. On the other hand, the ligand alone does not show any inhibitory effect, highlighting the importance of metal coordination in providing a therapeutic function.

2. Materials and methods

2.1. Materials and compounds preparation

All commercial chemicals used as starting materials and reagents in this study were purchased from Sigma-Aldrich and were of reagent grade.

The synthesis of 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) was performed as previously described [22]. Briefly a solution of NaOH 10% (7.5–12.5 ml)

was added dropwise to a mixture of thiosemicarbazide (10 mmol) and 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one (10 mmol) in methanol (15 ml). The reaction mixture was kept under stirring for 1 h at room temperature. The resulting solid was filtered off, washed with water, and dried *in vacuo*. The synthesis of [Cu(PyCT4BrPh)Cl] complex was obtained as previously described [23] by refluxing a methanol solution of the ligand with copper(II) chloride in 1:1 ligand-to-metal molar ratio. The resulting solid was washed with methanol followed by diethylether and then dried *in vacuo*.

2.2. Topoisomerase IB production and purification

EKY3 yeast cells (ura3-52, his3 Δ 200, leu2 Δ 1, trp1 Δ 63, top1:TRP1, MAT α) were transformed with YCpGAL1-e-wild-type plasmid, in which the human topoisomerase IB is expressed under the galactose inducible promoter [24]. The culture was grown in SC-uracil 2% dextrose over-night, diluted 1:100 in SC-uracil 2% raffinose and induced at an OD_{595nm} = 1 with 2% galactose for 6 h at 30 °C, 140 rpm. The cells were harvested by centrifugation, resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% (v/v) glycerol completed with protease inhibitors cocktail (Roche 1 836 153) supplemented with 0.1 mg/ml sodium bisulfite and 0.8 mg/ml sodium fluoride and disrupted using 425–600 μ m diameter glass beads alternating vortexing for 30 s with 30 s on ice. The extract was loaded onto 1 ml ANTI-FLAG M2 Affinity Gel column equilibrated as described in the technical bulletin (Sigma). Topo IB interacts with the resin through the N-terminal sequence FLAG: DYKDDDY, and it is eluted with five column volumes of buffer containing 100 μ g/ml FLAG peptide. Fractions were collected and glycerol was added to a final concentration of 40%. All preparations were stored at –20 °C [25].

2.3. DNA relaxation assay

To determine the units/ μ l of topo IB 1 μ l of enzyme solution was diluted 3, 9, 27, 81-fold in reaction buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1 mM Na₂EDTA, 10 mM MgCl₂, 50 μ g/ml acetylated BSA and 150 mM KCl, pH 7.5) before addition of 0.5 μ g of negatively supercoiled pBlue-Script KSII(+) DNA in 30 μ l of reaction volume. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min. One unit is defined as the amount of enzyme required to completely relax 0.5 μ g of negative supercoiled plasmid DNA in 30 min at 37 °C.

One unit of topoisomerase IB was incubated with 0.5 μ g of supercoiled DNA in 30 μ l containing reaction buffer. To assess the effects of HPyCT4BrPh, complex (1) and CuCl₂ on topo IB activity different concentrations of each compound were added. Reactions

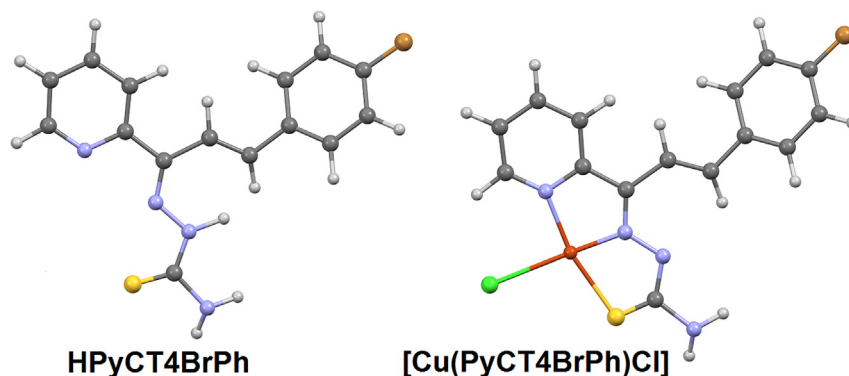


Fig. 1. Structures of HPyCT4BrPh and complex (1). The atoms are depicted as follows: C, dark gray; N, blue; H, light gray; Cl, green; Cu, orange; S, yellow; Br, brown. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were stopped with 0.5% SDS after 30 min at 37 °C. The samples were electrophoresed in a horizontal 1% agarose gel in TBE buffer (50 mM Tris, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA). The gel was stained with ethidium bromide (5 µg/ml), destained with water and photographed under UV illumination. Where indicated, enzyme and inhibitor or DNA and inhibitor were pre-incubated at 37 °C for 5 min, prior of the addition of substrate or enzyme respectively. The mixture was then incubated at 37 °C for 15 min. Assays were performed at least three times and representative gels are shown [26].

2.4. Kinetics of cleavage

The oligonucleotide CL14 (5'-GAAAAAGACTTAG-3'), radiolabelled with γ -³²ATP at its 5' end, was annealed with a 2-fold molar excess of CP25 complementary strand (5'-TAAAAATTTTC-TAAGTCTTTTTC-3') to produce the "suicide substrate", containing a partial duplex. 2.5 units of enzyme were incubated with 20 nM of suicide substrate in reaction buffer at 37 °C in the absence or in the presence of 12 µM complex (1). DMSO was added as a control. Before protein addition 5 µl of the reaction mixture were removed and used as the zero time point. At different time points 5 µl aliquots were removed and 0.5% SDS was added to stop the reaction. All the samples were precipitated in ethanol, digested with trypsin and analyzed using denaturing 7 M urea/20% polyacrylamide gel electrophoresis. The experiment was replicated at least three times and a representative gel is shown. The percentage of cleavage at the preferential site (CL1) was quantified through PhosphorImager and ImageQuant software, comparing the amount of the CL1 product obtained in each lane to the maximal CL1 level obtained at the longest time point in the absence of compound [27].

2.5. Religation kinetics

The CL14/CP25 substrate (20 nM), prepared as described above, was incubated with 2.5 units of topo IB for 30 min at 37 °C in reaction buffer to permit cleaved complex formation. DMSO or 12 µM complex (1) were added to the solution and religation reactions was initiated by adding a 200-fold molar excess of R11 oligonucleotide (5'-AGAAAAATTTT-3') over the duplex CL14/CP25. At different time points 5 µl aliquots were removed and the reaction stopped with 0.5% SDS. All the samples were precipitated in ethanol, digested with trypsin and analyzed using denaturing 7 M urea/20% polyacrylamide gel electrophoresis. The experiment was replicated at least three times and a representative gel is shown. The percentage of the remaining covalent complex was determined by PhosphorImager and Image-Quant software and normalized relative to the total amount of radioactivity in each lane [28].

2.6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The assay was performed using the CL25/CP25 full duplex DNA as a substrate, obtained by annealing radiolabelled CL25 (5'-GAAAAAGACTTAGAAAAATTTT-3') and the complementary strand CP25. The reactions were performed using the catalytically inactive mutant Tyr723Phe. The substrate (0.5 nM) was incubated with the enzyme in the presence of DMSO, 12 µM complex (1) or 50 µM camptothecin in reaction buffer at 37 °C for 10 min, in a final volume of 30 µl. The reactions were added of 3 µl of dye (0.125% Bromophenol Blue and 40% (v/v) glycerol) and loaded into 6% (v/v) polyacrylamide gels and electrophoresed at 40 V in TBE (12 mM Tris, 11.4 mM boric acid and 0.2 mM EDTA) at 4 °C for 4 h. As a control 12 µM complex (1) was incubated with substrate to show no change in electrophoretic mobility of DNA in the presence of compound [29].

Reaction products were visualized by PhosphorImage. Assay

was replicated at least three times and only one representative gel is shown.

2.7. Docking predictions

Docking experiments were performed using Autodock 4.2 with MGLTools 1.5.6 [30] to prepare the structure of the ligand and the receptors. Calculations were made with the genetic algorithm [31] and for each experiment 250 runs were carried out. The structure of the receptor for the docking with the free protein was taken from the crystal structures 1A36 [32] and 1EJ9 [33], upon reconstruction of the missing residues as previously described [34]. Upon elimination of the DNA substrate the structure of the protein was used to carry out the docking with the free enzyme. Calculation with the covalent complex was carried out using the structure of the 1K4S binary complex [35] upon reconstruction of the linker domain as previously described [36]. Elimination of the 12 bases downstream of the cleavage site gave rise to the "suicide" protein-DNA covalent complex used for the last experiment (Supplementary Fig. S1). Coordinates of the complex (1) were obtained from the crystal structure downloaded from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. The bromine atom, which is not present in the solved structure, was added to the compound and the structure regularized using the program Sybyl (Tripos, St. Louis, MO) prior the completion of the docking.

The analysis of the contacts between the ligand and the receptor was performed using a modified version of the program *g_mindist* from the Gromacs 4.6 package [37], taking a threshold value of 3.5 Å. Images were obtained with VMD visualization package [38].

2.8. Evaluation of the cytotoxic effect against human tumor cell lines

Cells were seed at densities/well of 100,000 for THP-1 cells. Adherent MCF-7 cells were inoculated at 10,000 cells/well. The plates were pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells prior to the addition of the test compounds. Freshly prepared solutions of the compounds were screened at 10 µM. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5% CO₂ and 100% relative humidity. Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). All substances were dissolved in DMSO prior to dilution. IC₅₀ values were determined over a range of ten-fold concentrations (100–0.001 µM). All compounds were tested in triplicate, in three independent experiments.

2.8.1. In vitro cell viability MTT assay

MTT is a tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals mainly by mitochondrial succinate dehydrogenase and the color intensity of the formazan dye is correlated to the number of viable cells [39]. Briefly, at the end of the incubation of the cells with the different compounds, 20 µl of MTT solution (5 mg/ml in phosphate-buffered saline) were added to each well and incubated for 4 h. The supernatant was removed and 200 µl of 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 595 nm. Controls included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation, relative to cells incubated with the 0.5% DMSO control and were calculated as follows: viability (%) = (mean OD treated – mean OD background)/(mean OD untreated cultured, i.e. 0.5% DMSO – mean OD blank wells) x 100. Interactions of compounds and media were estimated on the basis of the variations

between drug-containing medium and drug-free medium to escape from false-positive or false-negative in relation to the control [40].

3. Results

3.1. Cytotoxic activity

The cytotoxic effects (IC_{50}) of HPyCT₄BrPh and complex (1) against THP-1 leukemia and MCF-7 breast cancer cells are reported in Table 1. The complex (1) is more active than the free thiosemicarbazone as already reported for MDA-MB (breast cancer) and HCT-116 (colorectal cancer) tumor cells [41]. Upon coordination to copper(II), the cytotoxicity of HPyCT₄BrPh increased 6-fold against THP-1 and 8-fold against MCF-7 cells.

As a control CuCl₂ at the same concentration was inactive as already shown for several leukemia and solid tumor cells [23]. These results indicate the importance of thiosemicarbazone metal coordination in providing cytotoxicity against these two tumor cell lines.

3.2. Topoisomerase IB inhibition

The inhibitory effect of the compounds on topoisomerase IB activity was tested through an agarose gel electrophoresis assay, comparing the different mobility among supercoiled DNA plasmid and the relaxed forms of DNA (topoisomers), produced by the enzyme activity. Circular plasmid DNA can exist in different topological conformations, that maintain the same sequence and molecular weight but that having a different degree of compactness migrate in different way i.e. supercoiled DNA migrates in an agarose gel faster than the relaxed topoisomers.

Topo IB efficiently relaxes the supercoiled substrate, as it can be appreciated from the disappearance of the band belonging to the supercoiled DNA substrate (SC) and the appearance of new bands corresponding to relaxed DNA topoisomers (Fig. 2A, compare lane 1 and lane 3). The activity is hardly affected by the increase of thiosemicarbazone concentration up to 50 μ M (Fig. 2A, lanes 4–10), on the contrary topo IB activity is significantly reduced when the enzyme is incubated with complex (1). The inhibition starts at a concentration of 0.75 μ M and it is almost complete at 3 μ M (Fig. 2B). As a control it has been observed that addition of CuCl₂ does not inhibit the enzyme up to a concentration of 200 μ M, confirming that the effect detected at low complex (1) concentration cannot be due to the free metal (Fig. 2A and C).

3.3. Preincubation effect on topolB activity

Complex (1) was pre-incubated with the enzyme or the DNA alone to verify the effect of pre-incubation in a time course relaxation inhibition assay (Fig. 3). Pre-incubating the enzyme with 0.75 μ M complex (1), a concentration not sufficient to fully inhibit the enzyme (Fig. 3, lanes 6–9), before DNA addition results in full inhibition suggesting that the complex interacts with the enzyme alone (Fig. 3, lanes 10–13). Pre-incubation of complex (1) with the DNA substrate alone, before enzyme addition, does not increase the

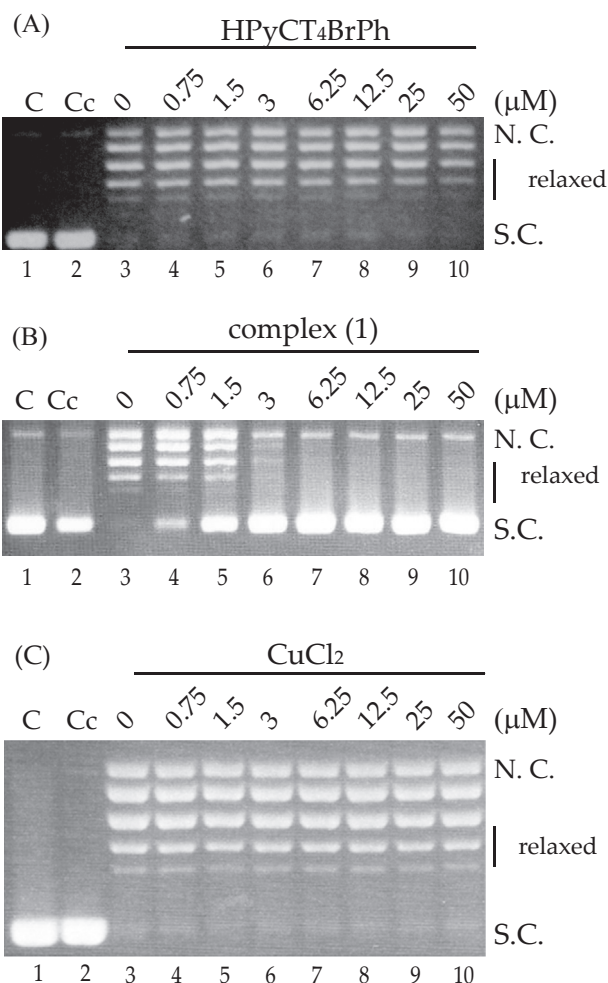


Fig. 2. Relaxation of negative supercoiled plasmid by topo IB in the presence of increasing concentrations of (A) HPyCT₄BrPh, (B) complex (1), (C) CuCl₂ (lanes: 4–10). Lane 1: substrate. Lane 2: substrate plus an excess of (A) HPyCT₄BrPh, (B) complex (1), (C) CuCl₂. Lane 3: substrate plus enzyme and DMSO. N.C.: nicked circular DNA. S.C.: supercoiled DNA.

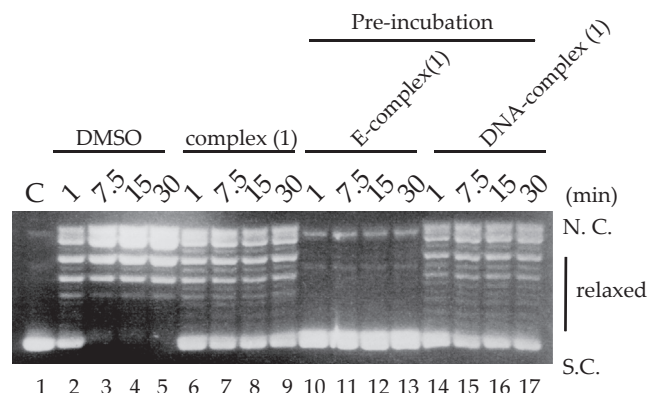


Fig. 3. Relaxation of supercoiled DNA by topo IB as a function of time in the presence of DMSO (lanes 2–5), 0.75 μ M complex (1) (lanes 6–9), 5 min enzyme-complex (1) pre-incubation before DNA addition (lanes 10–13), 5 min DNA-complex (1) pre-incubation before enzyme addition (lanes 14–17). Lane 1: substrate. N.C.: nicked circular DNA. S.C.: supercoiled DNA.

Table 1
Cytotoxic effect (IC_{50}) of compounds against THP-1 and MCF-7 cancer cells.

Compound	IC_{50} (μ M)	
	THP-1	MCF-7
HPyCT ₄ BrPh	1.27 (± 0.32)	1.23 (± 0.25)
[Cu(PyCT ₄ BrPh)Cl]	0.20 (± 0.06)	0.16 (± 0.06)

extent of inhibition observed in the absence of the pre-incubation (Fig. 3, lanes 14–17). As a control, the experiment in the presence

of DMSO, at the same concentration used to dissolve complex (1), shows that the enzyme is fully active, confirming that the inhibition depends on the presence of the metal complex (Fig. 3, lanes 2–5).

3.4. Cleavage and religation rate

The cleavage step of the catalytic cycle of topo IB has been studied using the oligonucleotide CL14, radiolabeled at its 5'-end, annealed with the CP25 complementary strand to produce a duplex oligonucleotide with 11 nucleotides single strand extension. This substrate is named "suicide substrate" (Fig. 4A), because when the enzyme cuts it at its preferential site, indicated by an asterisk in Fig. 4A, the religation step is precluded, because the cleaved AG-3' oligonucleotide is too short to be religated. The enzyme remains covalently attached to the 12-oligonucleotide 3'-end forming the cleavage complex (CL1) that increases as a function of time, as shown in Fig. 4B. The cleavage reaction is fast in the absence of complex (1) and approximately 80% of the reaction occurs within 15 s (Fig. 4B and C). In the presence of 12 μ M complex (1) the cleavage reaction is strongly inhibited and the quantity of cleaved substrate, normalized at the plateau value obtained in the absence of compound, is reduced to 20% even after 1 h, as shown in Fig. 4C.

The religation rate has been measured incubating the suicide substrate with an excess of enzyme to allow cleavage complex formation (Fig. 5A, lanes 2 and 9). A 200-fold molar excess of an R11 complementary oligonucleotide is then added permitting the enzyme to produce a full duplex oligonucleotide as final product. The urea-polyacrylamide gel electrophoresis of the products shows

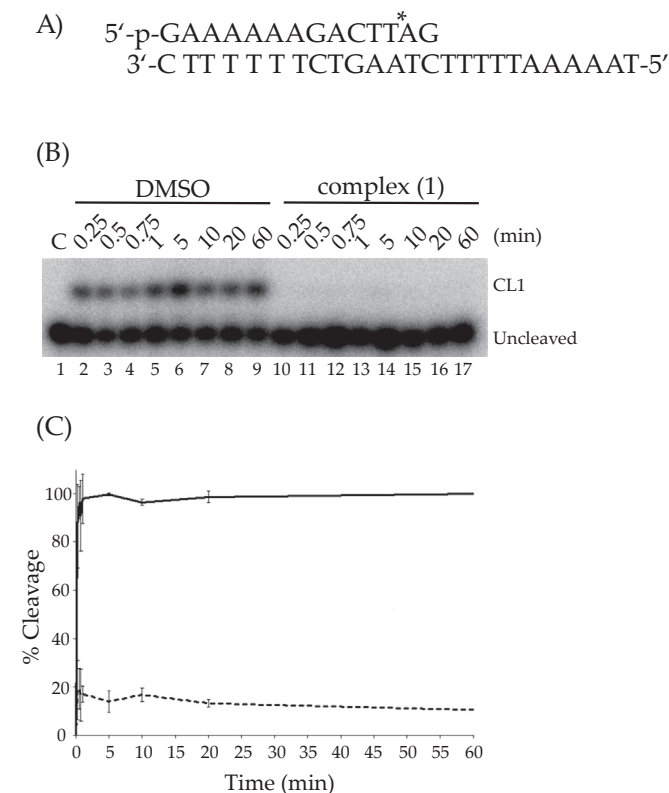


Fig. 4. (A) "Suicide substrate" for cleavage reaction. The asterisk indicates the preferential cleavage site. (B) Urea/polyacrylamide gel of cleavage products obtained in the absence (lanes 2–9) and in the presence of 12 μ M complex (1) (lanes 10–17). Lane 1: substrate. CL1: cleavage complex. (C) % of cleavage plotted as a function of time in the absence (full line) and in the presence of 12 μ M complex (1) (dotted line). The data reported are the average \pm SD of three independent experiments.

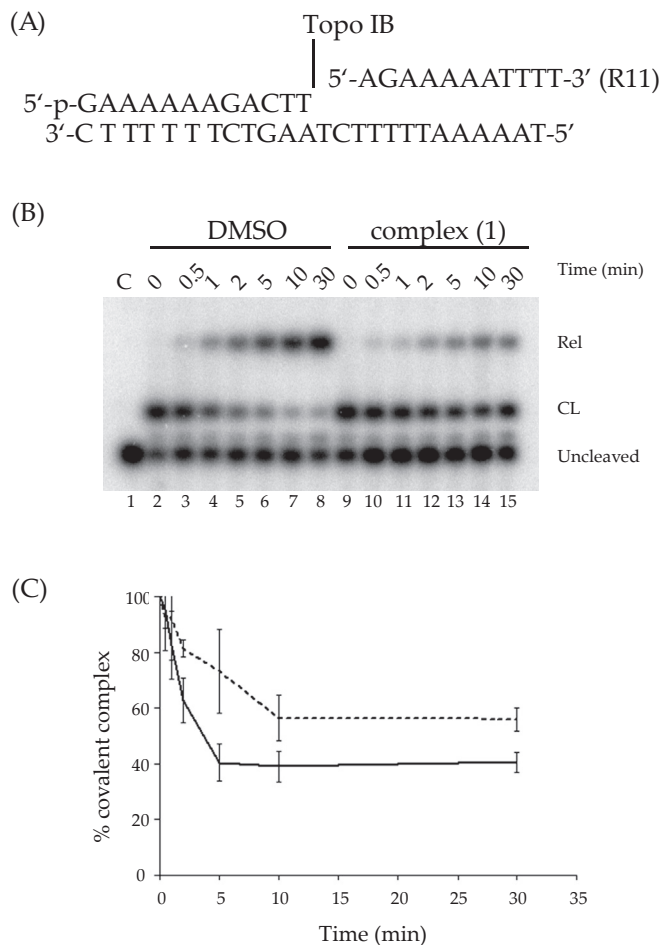


Fig. 5. (A) Schematic representation of religation reaction. (B) Urea/polyacrylamide gel of products of religation reaction performed by topo IB in the absence (lanes 2–8) and in the presence of 12 μ M complex (1) (lanes 9–15). Lane 1: substrate. Rel: religated product. CL1: preferential cleavage site. Uncleaved: substrate. (C) % of remaining covalent complex as a function of time in the absence (full line) and in the presence of complex (1) (dotted line). The data reported are the average \pm SD of three independent experiments.

that the presence of 12 μ M complex (1) reduces the rate of the reaction, indicating that the compound partially inhibits the religation step (Fig. 5B), as confirmed by the quantitative plot reported in Fig. 5C.

3.5. Electrophoresis mobility shift assay

An Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) was carried out using the catalytically inactive Tyr723Phe mutant. Using this mutant the effect of the compound on the chemistry of the cleavage reaction are eliminated, because the protein can not carry out the nucleophilic attack to the DNA phosphodiesteric bond, but it can still non-covalently bind to DNA. The assay was performed incubating a full duplex DNA radiolabeled substrate (CL25/CP25), containing the preferred cleavage site of topo IB, with the enzyme Tyr723Phe. After incubating the enzyme and DNA a retard on the electrophoretic mobility relative to the unbound DNA is observed due to the formation of an enzyme-DNA non covalent complex (Fig. 6, compare lanes 1 and 3). In the presence of 12 μ M complex (1) the band corresponding to the non-covalent complex is not observed (Fig. 6, compare lanes 1 and 4), indicating that complex (1) does not permit the interaction between DNA and the enzyme

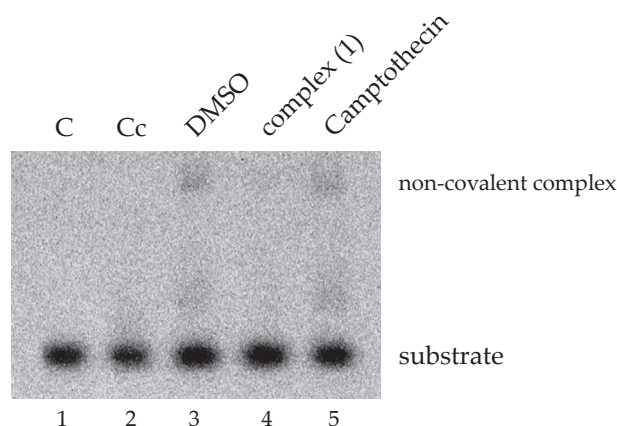


Fig. 6. Electrophoretic mobility shift assay. Lane 1: substrate. Lane 2: substrate in the presence of 12 μM complex (1). Substrate plus enzyme in the presence of DMSO (lane 3), 12 μM complex (1) (lane 4) and 50 μM CPT (lane 5).

and so providing an explanation for the absence of the cleavage activity in the presence of the metal complex.

3.6. Prediction of the complex (1) binding mode

Docking experiments between complex (1) and the protein alone or the covalent protein-DNA complex were carried-out. In the protein alone the compound is spread in several regions over the entire protein structure, with a binding energy ranging from -7.6 to -5.0 kcal/mol. In several of these sites the compound provokes steric hindrance for the DNA binding (Supplementary Fig. S1), thus providing an explanation for the inhibition of the cleavage activity (Fig. 4) and for the lack of the protein-DNA interaction reported by the EMSA experiments (Fig. 6). The docking with the covalent complex was performed using as a receptor the complex with a 22 bps DNA substrate cleaved at one strand or the complex containing the suicide substrate (Supplementary Fig. S2). The results are comparable. The most populated family of structures has a binding energy ranging from -7.3 to -6.7 kcal/mol and -8.0 to -7.0 kcal/mol for the covalent and suicide complexes respectively. In the first case the compounds lay at the interface between subdomain III and the linker domain (helix17-helix19) (Fig. 7A). Interestingly, complex (1) establishes contacts with Lys720 located on helix 20 that

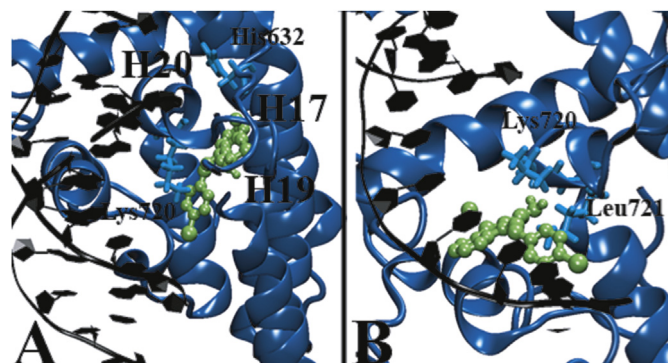


Fig. 7. Docking predictions of the complex (1) binding mode. Representative structure of the most populated family of structures in the docking with the (A) covalent complex and (B) suicide complex. In each panel the lateral chains of the residues interacting with the compound and the active site residue Tyr723 are shown in stick. The compound in the two panels is reported in lime and shown in Van der Waals representation. The helices are also defined as H17, H19 and H20.

contains the catalytic tyrosine, and with His632 that is a residue of the catalytic pentad. In the case of the docking with the suicide complex, the compound is located on helix 20 and interacts with Lys720 and Leu721 (Fig. 7B). Such interactions hinders the interaction with the substrate, providing an atomistic explanation for the religation inhibition (Fig. 5).

4. Conclusions

HPyCT4BrPh and its copper(II) complex [Cu(PyCT4BrPh)Cl] (1), already known to be cytotoxic agents against HL60 leukemia cells, MDA-MB 231 and HCT-116 tumor cells, are shown to have cytotoxic effect also against THP-1 and MCF-7 cells. Coordination of the thiosemicarbazone to copper(II) improves the effect, making complex (1) more efficient than the parental compound (Table 1). In fact the ligand HPyCT4BrPh shows some cytotoxic activity, but upon coordination to copper(II) to form complex (1) the cytotoxic effect increases 6-fold against THP-1 leukemia cells and 8-fold against MCF-7 solid tumor cells (Table 1). This effect is due to complex (1) since addition of CuCl_2 does not induce any toxicity. Thiosemicarbazones have been suggested to exert their antineoplastic activity through several mechanisms such as Fe chelation, in this way being responsible for the iron impoverishment of the biological systems. They may also act through the redox cycling properties of the resulting Fe^{II} -thiosemicarbazones complex, inhibiting essential enzymes such as ribonucleotide reductase [42]. Other mechanisms are also described, such as inhibition of topoisomerase II α , for which the binding of thiosemicarbazone to the ATP hydrolysis domain was shown to be responsible for enzyme inhibition [18].

Here we investigate the ability of HPyCT4BrPh and its copper(II) complex [Cu(PyCT4BrPh)Cl] (1) to inhibit human topoisomerase IB. For the first time we show that, after complexation with copper, the thiosemicarbazone becomes an efficient inhibitor of topoisomerase I. Complex (1) acts inhibiting the cleavage step of topo I catalytic cycle (Fig. 4). In particular complex (1) prevents enzyme-DNA binding, as demonstrated by the EMSA experiment reported in Fig. 6. This mechanism of action permits the classification of the copper complex as topo IB inhibitor although the compound is also able to partially affect the religation step (Fig. 5). Docking analyses support these results, showing that steric hindrance (Fig. 7) is responsible for DNA binding and religation step inhibition.

It is interesting that the topoisomerase inhibition activity is only observed upon copper(II) complexation highlighting the role of the metal in producing the right geometry to interact with the enzyme active site. The strategy of metal coordination is an interesting route that has been pursued for several ligands to confer them possible therapeutic effect and it is here shown to be successful also for the thiosemicarbazone ligand. This finding can increase the potential use of thiosemicarbazones as anticancer agents and confirms the important role of metal coordination in modulating the target of this class of compounds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.07.009>.

References

- [1] L. Baranello, F. Kouzine, D. Levens, DNA topoisomerases beyond the standard role, *Transcription* 4 (2013) 232–237.
- [2] J.J. Champoux, DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 369–413. Review.
- [3] K.D. Corbett, J.M. Berger, Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 95–118. Review.

- [4] Y.H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu, Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 14873–14878.
- [5] M.A. Bjornsti, P. Benedetti, G.A. Viglianti, J.C. Wang, Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin, *Cancer Res.* 49 (1989) 6318–6323.
- [6] J.F. Pizzolato, L.B. Saltz, The camptothecins, *Lancet* 361 (2003) 2235–2242. Review.
- [7] Y.H. Hsiang, L.F. Liu, Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin, *Cancer Res.* 48 (1988) 1722–1726.
- [8] Y.H. Hsiang, M.G. Lihou, L.F. Liu, Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin, *Cancer Res.* 49 (1989) 5077–5082.
- [9] Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand, DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chem. Biol.* 17 (2010) 421–433. Review.
- [10] S. Castelli, A. Coletta, I. D'Annessa, P. Fiorani, C. Tesauro, A. Desideri, Interaction between natural compounds and human topoisomerase I, *Biol. Chem.* 393 (2012) 1327–1340. Review.
- [11] S. Castelli, P. Katkar, O. Vassallo, M. Falconi, S. Linder, A. Desideri, A natural anticancer agent thapsigargin targets human topoisomerase IB, *Anticancer Agents Med. Chem.* 13 (2013) 356–363.
- [12] H. Beraldo, D. Gambino, The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31–39. Review.
- [13] J.E. Karp, F.J. Giles, I. Gojo, L. Morris, J. Greer, B. Johnson, M. Thein, M. Sznol, J. Low, A phase I study of the novel ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine) in combination with the nucleoside analog fludarabine for patients with refractory acute leukemias and aggressive myeloproliferative disorders, *Leuk. Res.* 32 (2008) 71–77.
- [14] S. Wadler, D. Makower, C. Clairmont, P. Lambert, K. Fehn, M. Sznol, Phase I and pharmacokinetic study of the ribonucleotide reductase inhibitor, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, administered by 96-hour intravenous continuous infusion, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 1553–1563.
- [15] A. Popović-Bijelić, C.R. Kowol, M.E. Lind, J. Luo, F. Himo, E.A. Enyedy, V.B. Arion, A. Gräslund, Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): a combined experimental and theoretical study, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1422–1431.
- [16] Y. Aye, M.J. Long, J. Stubbe, Mechanistic studies of semicarbazone triapine targeting human ribonucleotide reductase in vitro and in mammalian cells: tyrosyl radical quenching not involving reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 35768–35778.
- [17] V.A. Rao, S.R. Klein, K.K. Agama, E. Toyoda, N. Adachi, Y. Pommier, E.B. Shacter, The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase II α in breast cancer cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 948–957.
- [18] Huang H1, Q. Chen, X. Ku, L. Meng, L. Lin, X. Wang, C. Zhu, Y. Wang, Z. Chen, M. Li, H. Jiang, K. Chen, J. Ding, H. Liu, A series of α -heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase II α catalytic activity, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 3048–3064.
- [19] B.M. Zeglis, V. Divilov, J.S. Lewis, Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 2391–2398.
- [20] K.W. Tan, H.L. Seng, F.S. Lim, S.C. Cheah, C.H. Ng, K.S. Koo, M.R. Mustafa, S.W. Ng, M.J. Maah, Towards a selective cytotoxic agent for prostate cancer: interaction of zinc complexes of polyhydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones with topoisomerase I, *Polyhedron* 38 (2012) 275–284.
- [21] N.K. Sahu, S.S. Balbhadra, J. Choudhary, D.V. Kohli, Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 209–225.
- [22] J.G. Da Silva, C.C.H. Perdigão, N.L. Speziali, H. Beraldo, Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity, *J. Coord. Chem.* 66 (2013) 385–401.
- [23] J.G. Da Silva, A.A. Recio Despaigne, S.R.W. Louro, C.C. Bandeira, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415–426.
- [24] G. Chillemi, P. Fiorani, S. Castelli, A. Bruselles, P. Benedetti, A. Desideri, Effect on DNA relaxation of the single Thr718Ala mutation in human topoisomerase I: a functional and molecular dynamics study, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 3339–3350.
- [25] S. Vieira, S. Castelli, M. Falconi, J. Takarada, G. Fiorillo, F. Buzzetti, P. Lombardi, A. Desideri, Role of 13-(di)phenylalkyl berberine derivatives in the modulation of the activity of human topoisomerase IB, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 68–75.
- [26] S. Castelli, A. Campagna, O. Vassallo, C. Tesauro, P. Fiorani, P. Tagliatesta, F. Oteri, M. Falconi, H.K. Majumder, A. Desideri, Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits human topoisomerase IB with a mechanism different from camptothecin, *Arch. Biochem. Biophys.* 486 (2009) 103–110.
- [27] S. Vieira, S. Castelli, A. Desideri, Importance of a stable topoisomerase IB clamping for an efficient DNA processing: effect of the Lys369Glu mutation, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 76–82.
- [28] I.E. León, J.F. Cadavid-Vargas, I. Tiscornia, V. Porro, S. Castelli, P. Katkar, A. Desideri, M. Bollati-Fogolin, S.B. Etcheverry, Oxidovanadium(IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model, *J. Biol. Inorg. Chem.* 20 (2015) 1175–1191.
- [29] P. Katkar, A. Coletta, S. Castelli, G.L. Sabino, R.A. Couto, A.M. Ferreira, A. Desideri, Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity, *Metallomics* 6 (2014) 117–125.
- [30] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.
- [31] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662.
- [32] L. Stewart, M.R. Redinbo, X. Qiu, W.G.J. Hol, J.J. Champoux, A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science* 279 (1998) 1534–1541.
- [33] M.R. Redinbo, J.J. Champoux, W.G. Hol, Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA, *Biochemistry* 39 (2000) 6832–6840.
- [34] G. Chillemi, I. D'Annessa, P. Fiorani, C. Losasso, P. Benedetti, A. Desideri, Thr729 in human topoisomerase I modulates anti-cancer drug resistance by altering protein domain communications as suggested by molecular dynamics simulations, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5645–5651.
- [35] B.L. Staker, K. Hjerrild, M.D. Feese, C.A. Behnke, A.B. Burgin, L. Stewart, The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 15387–15392.
- [36] G. Mancini, I. D'Annessa, A. Coletta, G. Chillemi, Y. Pommier, M. Cushman, A. Desideri, Binding of an Indenoisoquinoline to the topoisomerase-DNA complex induces reduction of linker mobility and strengthening of protein-DNA interaction, *PLoS One* 7 (2012) e51354.
- [37] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: algorithm for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435–447.
- [38] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph* 33 (1996) 27–28.
- [39] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [40] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood, Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay, *Chemotherapy* 50 (2004) 43–50.
- [41] J.G. Da Silva, A.A. Recio Despaigne, S.R. Louro, C.C. Bandeira, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415–426.
- [42] Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5271–5294.

Anexo: Manuscrito a ser submetido

1 **Nitrogen-mustard-derived Schiff bases: cytotoxic effects against melanoma and**
2 **investigation on the mode of action**

3 Luciana B. P. Sâmia^a, Gabrieli L. Parrilha^a, Alexandre C. Bertoli^a, Helio A. Duarte^a, Nivaldo L.
4 Speziali^b, Sarah F. Teixeira^{c,d}, Bárbara Kawamura^d, Adilson Kleber Ferreira^{c,d,e,f}, Heloisa
5 Beraldo^{a,*}

6
7 ^a *Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

8 ^b *Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

9 ^c *Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,*
10 *São Paulo, Brazil.*

11 ^d *Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,*
12 *São Paulo, Brazil.*

13 ^e *Alchemy, Inovação, Pesquisa e Desenvolvimento, Departamento de Oncologia, CIETEC/IPEN,*
14 *Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.*

15 ^f *Medical Science, Universidade de São Paulo of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil*

16
17 *Address correspondence to this author at the Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
18 MG 31270-901, Brazil; Tel: +55 (31) 3409-5740; E-mail: hberaldo@ufmg.br heloisaberaldoufmg@gmail.com;
19
20

21 **Abstract**

22 Objective: Evaluation of the cytotoxic effects of nitrogen-mustard derived Schiff base compounds and
23 investigation on their mode of action.

24 Methods: 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-*N*(4)-phenyl-thiosemicarbazone (1), 4-[bis(2-
25 chloroethyl)amino]benzaldehyde-*N*(4)-*para*-chloro-phenyl-thiosemicarbazone (2), 4-[bis(2-
26 chloroethyl)amino]benzaldehyde-*N*(4)-methyl-thiosemicarbazone (3) and 4-[bis(2-
27 chloroethyl)amino]benzaldehyde-benzoylhydrazone (4) were obtained by functionalization of the bis(2-
28 chloroethyl)amino alkylating group with a thiosemicarbazone/hydrazone moiety. The compounds were
29 assayed on a panel of solid tumor cells and against non-malignant cells. The mode of action of compound
30 (1) was investigated. Theoretical studies on the reactivity of (1-4) as DNA alkylation agents were carried
31 out.

32 Results: When assayed on a panel of different tumor cells only (1) exhibited cytotoxic effects on B16F10
33 melanoma cells (IC₅₀ = 17.1±3.1µM). A cell viability assay on melanoma cells revealed that while (1) had
34 cytotoxic effects on B16F10 and A2058 cells, the structure-related hydrazone (4) was devoid of activity.
35 In addition, (1) was capable to reduce viability of melanoma cells without affecting the viability of non-
36 malignant human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Preliminary investigation on the mode of

37 action of (1) indicated that the compound induces cell death by necrosis. 1 mostly likely enhances the
38 sensibility of cells to chemotherapeutic agents by the reduction of Bcl-2 expression. Theoretical
39 calculations showed that all compounds (1-4) exhibit similar reactivity as DNA alkylating agents. Hence,
40 DNA alkylation might not occur, or if it occurs, it is probably not the dominant pathway in the cytotoxic
41 action of (1).

42 Conclusions: Compound (1) might be used in association with antimelanoma drugs. Further investigation
43 on this mechanism is needed in future studies.

44 **Keywords:** Nitrogen mustards; Schiff bases; cytotoxic activity; mode of action

45

46

47 1. Introduction

48 Cancer is a major public health problem in many parts of the world. Approximately 14 million
49 new cases and 8.2 million cancer-related deaths were reported in 2012, thus affecting life expectancy and
50 producing a negative impact on society. [1]

51 Chemotherapy is the major strategy to treat cancers. Alkylating agents are electrophilic species
52 that react with nucleophilic moieties of DNA or proteins leading to the covalent transfer of an alkyl group.
53 The cytotoxic effect of these agents is mainly due to the alkylation of DNA bases that can impair essential
54 DNA processes such as replication and/or transcription [2]. The alkylating agent Mechlorethamine
55 (Mustargen), derived from sulfur mustards, was the first to be employed for the treatment of leukemia and
56 lymphomas [2, 3]-[3].

57 Nitrogen mustards are alkylating agents which share a common *bis*(2-chloroethyl)amino group
58 with sulfur mustards. Nitrogen mustards were the first DNA alkylating drugs used in early cancer
59 chemotherapy in the 1950s. These compounds are presently used as therapeutics for leukemias and solid
60 tumors. Nitrogen mustards induce interstrand cross-linking of DNA mainly by alkylating the 7-position of
61 two guanines [4].

62 Drugs that directly bind to DNA bases or form cross-links, such as cisplatin and carboplatin or
63 nitrogen mustards are often used in combination therapies. The main mode of action of DNA-damaging
64 agents is related to DNA alterations that impact replication, an overactive process in rapidly dividing cancer
65 cells [4].

66 Thiosemicarbazones and hydrazones constitute an important class of compounds possessing a
67 wide range of pharmacological properties [5-7] [5-9]. These compounds exhibit cytotoxic activity against
68 solid tumor and leukemia cells [8-10] [10-12]. Modifications of the thiosemicarbazone/hydrazone
69 framework, in order to find new compounds with higher activity and/or to tune their biological activity
70 have been extensively studied [10-12] [12-16].

71 In order to add to the discovery of new anticancer drug candidates, we now obtained a family of
72 compounds containing the *bis*(2-chloroethyl)amino alkylating group functionalized with a
73 thiosemicarbazone/hydrazone moiety (Figure 1). The compounds were assayed for their cytotoxic activities
74 against B16F10 (melanoma), NCI-H460 (lung carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma),
75 A375 (skin malignant melanoma), A2058 skin (human metastatic melanoma) cancer cells, as well as against
76 non-malignant human umbilical vein endothelial cells, HUVEC.

77 Theoretical studies on the DNA alkylating ability of the compounds were carried out together with
78 a preliminary investigation on their mode of action.

79
80

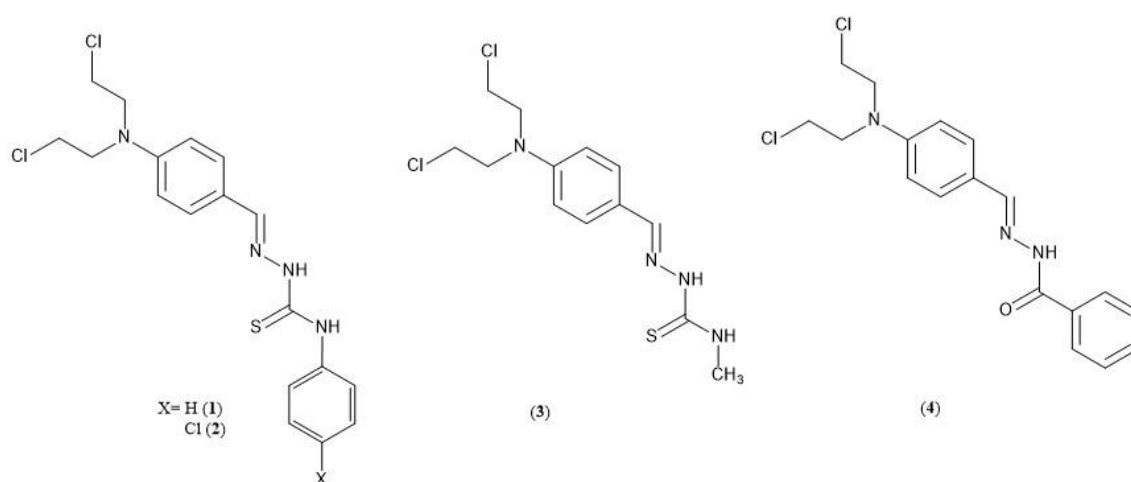


Figure 1. Structural representation of the nitrogen mustard-derived Schiff base compounds.

(Modifiquei a figura porque estava errada. O composto 2 o substituinte é Cl e não CH₃)

84 Experimental

85 2. Material and Methods

86 2.1 Physical measurements

87 All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.
88 Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. An YSI model 31

89 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded
90 on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000 e 400 cm⁻¹). NMR spectra
91 were obtained with a Bruker DPX-400 Avance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as solvent and
92 TMS as internal reference.

93 Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction
94 GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-Enhance Source Mo K α radiation ($\lambda =$
95 0.71073 Å) at 293(2) K. The CrysAlisPro software package [13] [17] was used for data collection, cell
96 refinements and data reduction. Absorption correction based on multi-scan method was applied using Olex2
97 [14] [18]. The structure was solved with the XT [15] [19] structure solution program using Intrinsic Phasing.
98 Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried on
99 using the XL [16] [20] refinement package. Positional and anisotropic atomic displacement parameters
100 were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional
101 parameters were refined using a riding model.

102

103 ~~Theoretical Calculations~~

104 2.2 Computational methods

105 Calculations based on Density Functional Theory (DFT) were carried out with Gaussian 09
106 packages [17] [21]. The different compounds and the reactions energies were calculated using the hybrid
107 exchange-correlation functional (XC), with Becke's three-parameter combined with the Lee, Yang and Parr
108 (LYP) correlation functional, denoted as B3LYP [18,19] [22,23] and the XC functional by Perdew, Burke
109 and Ernzerhof (PBE) [20,24] [24,25]. The standard Dunning/Huzinaga valence double zeta basis sets D95
110 [22] [26] and cc-pVDZ [23] [27] were employed. The geometries were fully optimized without symmetry
111 constraint. The harmonic frequency analyses were performed. Real frequencies assure that a minimum at
112 the potential energy surface was found.

113

114 2.3 Syntheses of the Schiff base compounds

115 The compounds were obtained by stirring under reflux a methanol solution of 4-[bis(2-
116 chloroethyl)amino]benzaldehyde (4.0 mmol) with the desired thiosemicarbazide/hydrazide in equimolar
117 amounts for 4 h. Two drops of HCl/ acetic acid were added to catalyze the reaction. The solids were filtered
118 off and washed with methanol and diethylether, and dried under reduced pressure.

119 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-*N*(4)-phenyl-thiosemicarbazone (**1**).

120 This compound has been previously prepared by other authors [24] [28].

121

122 4-[bis(2-chloroethyl) amino]benzaldehyde-*N*(4)-*para*-chlorophenyl-thiosemicarbazone,

123 (**2**). Yellow solid. Anal. Calc. for C₁₈H₁₉Cl₃N₄S: C, 50.30; H, 4.46; N, 13.04. Found: C, 50.36; H, 4.14; N,

124 13.28 %. FW: 429.79 g mol⁻¹. IR (KBr, cm⁻¹): ν (N-H) 3246–2978 m, ν (C=N) 1602 m, ν (C-S) 726 w. ¹H

125 NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm]: 6.80 (2H, d, H₂, H₆), 7.72 (2H, d, H₃, H₅), 8.06 (1H, s, H₇), 7.66 (2H,

126 d, H₁₀, H₁₄), 7.40 (2H, d, H₁₁, H₁₃), 3.78 (8H, d, H₁₅, H₁₇, H₁₆, H₁₈), 11.68 (1H, s, N(3)-H), 9.97 (1H,

127 s, N(4)-H). ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, ppm]: 122.2 (C₁), 111.7 (C₂, C₆), 129.4 (C₃, C₅), 148.1 (C₄),

128 143.8 (C₇=N), 175.0 (C₈=S), 128.9 (C₉), 126.9 (C₁₀, C₁₄), 127.8 (C₁₁, C₁₃), 138.2 (C₁₂), 51.8 (C₁₅,

129 C₁₇), 41.0 (C₁₆, C₁₈). Melting point: 171.0-172.2 °C. Yield: 70 %.

130 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-*N*(4)-methyl-thiosemicarbazone (**3**)

131 This compound has been previously reported by other authors [25] [29].

132

133 4-[bis(2-chloroethyl) amino] benzaldehybenzoylhydrazone (**4**). Yellow solid. Anal. Calc. for

134 C₁₈H₁₉Cl₂N₃O: C, 59.35; H, 5.26; N, 11.54. Found: C, 59.66; H, 5.85; N, 11.73%. FW: 364.26 g mol⁻¹. IR

135 (KBr, cm⁻¹): ν (N-H) 3200 w, ν (C=O) 1636 m, ν (C=N) 1604 m. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm]: 7.51

136 (2H, t, H₂,H₆), 6.81 (2H, d, H₃, H₅), 8.34 (1H, s, H₇), 7.90 (2H, d, H₁₀, H₁₄), 7.58-7.56 (3H, m, H₁₁,

137 H₁₃, H₁₂), 3.81-3.75 (8H, m, H₁₅,H₁₇;H₁₆,H₁₈), 11.57 (1H, s, N(3)-H). ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-

138 *d*₆, ppm]: 122.7 (C₁), 128.7 (C₂,C₆), 111.8 (C₃,C₅), 148.0 (C₄), 148.2 (C₇=N), 162.7 (C₈=O), 133.7 (C₉),

139 127.4 (C₁₀,C₁₄), 131.4 (C₁₁,C₁₃), 128.3(C₁₂), 51.9 (C₁₅,C₁₇), 41.0 (C₁₆,C₁₈). Melting point: 83.5-84.2

140 °C. Yield: 75 %.

141

142 2.4 X-ray crystallography

143 Crystals of (**2**) were obtained by slow evaporation of the mother liquor in the syntheses and crystals

144 of (**4**) were obtained upon slow evaporation in DMSO-*d*₆. A summary of the crystal data, data collection

145 details and refinement results for these compounds is listed in Table 1.

146

147

148 **Table 1.** Crystal data structure and refinement results for (**2**) and (**4**)

149

	(2)	(4)
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₉ Cl ₃ N ₄ S	C ₁₈ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O
Formula weight	429.79	364.26
Temperature/K	293(2)	293(2)
Crystal system, space group	Monoclinic, P21/c	Orthorhombic, Pca21
a (Å)	16.5839(3)	9.8199(3)
b (Å)	13.0854(2)	19.3212(7)
c (Å)	9.71070(10)	9.4660(3)
α (°)	90	90
β (°)	101.354(2)	90
γ (°)	90	90
V (Å ³)	2066.05(6)	1796.01(11)
Z	4	4
ρ _{calc} /cm ³	1.362	1.347
μ/mm-1	5.035	0.371
F(000)	864.0	760
2θ range for data collection/°	5.436 - 133.122	2.11-29.41
Index ranges	-19 ≤ h ≤ 19 -15 ≤ k ≤ 15 -11 ≤ l ≤ 11	-13 ≤ h ≤ 12 -25 ≤ k ≤ 26 -13 ≤ l ≤ 13
Reflections collected	32388	20532
Independent reflections	3640 [R _{int} = 0.0527, R _{sigma} = 0.0199	4550 [R _{int} = 0.0308
Data/restraints/parameters	3640/0/255	4550/1/217
Goodness-of-fit on F ²	1.038	1.054
Final R indexes [I >= 2σ (I)]	R ₁ = 0.0557, wR ₂ = 0.1534	R ₁ = 0.0433, wR ₂ = 0.1073
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0665, wR ₂ = 0.1661	R ₁ = 0.0537, wR ₂ = 0.1145
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.65/-0.32	0.407/-0.473

150
151

152 ***Biological activity***

153 *2.5 Cell cultures*

154 The B16F10 (murine melanoma), NCI-H460 (human non-small cell lung cancer), MCF7 (human
155 breast cancer), A 2058 skin (human metastatic melanoma) and HUVEC (human umbilical vein endothelial
156 cells) lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The cell lines
157 were maintained in RPMI media supplemented with fetal bovine serum (10%), and 1% penicillin-
158 streptomycin at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂.

159 *2.6 Cell viability assay*

160 ***Cytotoxic activity***

161 The cellular viability was evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
162 bromide (MTT) assay to determinate the half maximal inhibitory concentration of cellular viability (IC₅₀)

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

172

173 2.7 Annexin V/Propidium iodide assay

174 For apoptosis/necrosis evaluation the FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen Inc.,
175 UK) was employed. B16F10 cells were planted in 12-well plates (5×10^5 cells/well) grown overnight and
176 then exposed to compound (**1**) (10 and 20 μM), or cisplatin (positive control for apoptosis) for 12 h. Then
177 5 μL of staining FITC annexin V and 1 μL of 100 $\mu\text{g/mL}$ PI were added to each 100 μL of cell suspension.
178 The cells were collected, centrifuged and resuspended in an appropriated buffer for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$ in the
179 dark. The analyses were performed by flow cytometry acquiring 10,000 events per sample using
180 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA). Fluorescence emission was recorded at 530
181 nm. Data analyses were performed by using FlowJo software (TreeStar, CA, USA)

182

183 2.8 Western blot analysis

184 To further evaluate the mechanism of action of compound (**1**) the expression levels of proteins of
185 apoptotic signaling pathways were investigated. B16F10 cells were plated in 6-well culture plates, grown
186 overnight and then exposed to **1** (10 and 20 μM) or 50 μM of cisplatin (positive control for apoptosis) for
187 24h. After the treatment, the cells were lysed with lysis buffer supplemented with protease and phosphatases
188 inhibitors (Cell Signalling Technology Inc). Protein concentration was measured using Bio-Rad Protein
189 Assay (Hercules, CA, USA). After, SDS-PAGE proteins were transferred to polyvinylidenedifluoride
190 (PVDF, 0.45 μm) membranes (Millipore Immobilon). Membranes were blocked and incubated with
191 primary antibodies (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). Following incubation, the membranes were

192 washed with PBS-T and once with PBS, and the images were acquired using the ChemiDoc Imaging
193 Systems. (Biorad).

194

195 2.9 Statistical analyses

196 GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA) was utilized for all tests. All values were expressed as mean
197 \pm SD. Each value is the mean of at least three independent experiments in each group. Two-way analysis
198 of variance were performed (ANOVA) with Tukey Post-Hoc test or Student's t-test.

199

200

201 3. Results and Discussion

202 3.1 Formation of compounds

203 Microanalyses, IR and NMR data were compatible with the formation of (1-4)

204

205 3.2 Spectroscopic characterization

206 The vibration attributed to $\nu(\text{N-H})$ was found at 3246 (2) and 3200 cm^{-1} (4). The $\nu(\text{C=S})$
207 absorption was observed at 726 cm^{-1} in the spectrum of 2 [25] [29] and the $\nu(\text{C=O})$ vibration was found at
208 1636 cm^{-1} in the spectrum of 4 [9] [11].

209 The NMR spectra were recorded in $\text{DMSO-}d_6$. The ^1H resonances were assigned on the basis of
210 chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless
211 enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons
212 were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

213 In the ^1H NMR spectra of 2 and 4 ($\text{DMSO-}d_6$), the signals of N3-H at δ 11.68 and δ 11.57 are
214 characteristic of N3-H hydrogen bonded to the solvent [26] [30]. The *E* stereochemistry of 2 and 4 in DMSO
215 solution was confirmed by their NOESY spectra, which show the N3-H/H7 coupling.

216

217 3.3 X-ray diffraction analysis

218 Figure 2 shows the molecular structures of (2) and (4). Table 2 reports selected intra-molecular
219 bond distances and Table 3 lists selected bond angles in the structures of 2 and 4 together with bond
220 distances and angles for 1 and 3 reported in the literature. The bond distances and angles are very similar
221 in (1-4) and are comparable to those of other thiosemicarbazones /hydrazones [27,28] [31,32]. Hence, the

222 fact that only **1** showed cytotoxic effects while the remaining compounds were inactive is not attributable
223 to differences in bond distances and angles at least in the crystal.

224

225 **Table 2.** Selected bond lengths (Å) for (**1-4**)

Bond Length	L2 (1)¹	L3 (2)	L4 (3)²	L5 (4)
C1-C7	1.452 (3)	1.447(4)	1.450(4)	1.456(3)
N2-C7	1.277 (2)	1.276(3)	1.271(4)	1.274(3)
N2-N3	1.381(2)	1.379(3)	1.380(3)	1.393(2)
N3-C8	1.341(2)	1.343(3)	1.344(4)	1.345(3)
N4-C8	1.341(3)	1.343(4)	1.320(4)	
N4-C9	1.428(2)	1.426(4)	1.452(4)	
C8-S1	1.6868(19)	1.687(3)	1.683(3)	
C8-O1				1.225(2)
C4-N1	1.384(2)	1.383(4)	1.391(5)	1.392(2)

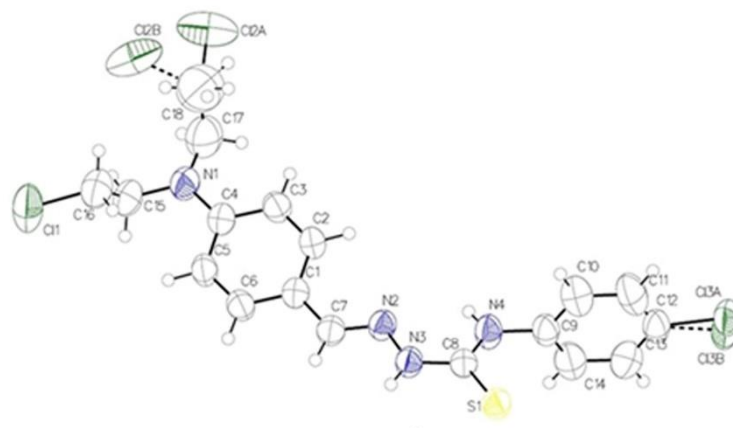
226

227 **Table 3.** Selected bond angles (°) for (**1-4**).

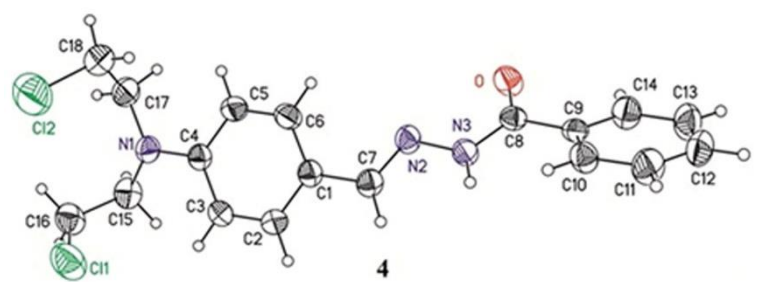
Bind Angles	L2 (1)¹	L3 (2)	L4 (3)²	L5 (4)
N4-C8-S1	124.34(14)	124.1(2)	124.1(2)	
C8-N4-C9	123.38(16)	123.2(2)	123.4(3)	
N3-C8-N4	116.20(17)	115.6(2)	116.3(3)	
N3-C8-S1	119.43(14)	120.2(2)	119.6(2)	
C7-N2-N3	114.81(17)	115.4(2)	116.0(3)	115.85(16)
C8-N3-N2	120.13(16)	120.1(2)	120.0(3)	118.21(16)
N3-C8-O				122.78(18)
N3-C8-C9				116.26(17)
C1-C7-N2				120.39(18)

¹ [24] [28]

² [25] [29]



2



4

228

229

230 **Figure 2.** Molecular plots of **2** and **4** showing the labeling scheme of the non-H atoms and their
 231 displacement ellipsoids at the 50% probability level.

232 3.4 *In vitro* screening in a panel of tumor cells reveals 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-*N*(4)-
233 phenyl-thiosemicarbazone (**1**) as a new antimelanoma drug candidate

234 The cytotoxic effects of the compounds were evaluated in a panel of tumor cell lines. Cells were
235 treated for 24h with increasing concentrations of the compounds. The MTT assay was used to evaluate their
236 cytotoxic effects. As shown in Table 4, only **1** exhibited cytotoxic effects. These effects were observed only
237 on B16F10 melanoma cells with IC₅₀ of (17.1±3.1). In contrast, **1** did not induce cytotoxic effects in non-
238 malignant HUVEC cells.

239 Hence, to further evaluate the cytotoxic effects of **1** against melanoma, we extended the cell
240 viability assay to a panel of melanoma cells. We also investigated the cytotoxic effects of the structure-
241 related hydrazone **4** against the same melanoma cell lineages. While **4** was devoid of activity, **1** showed
242 cytotoxic effects on A2058 melanoma cells whereas A375 melanoma cells were resistant to **1** after 24h of
243 treatment (Table 4).

244 Therefore, **1** was capable to reduce the cell viability of B16F10 (murine) and A2058 (human)
245 melanoma cells without affecting the viability of human endothelial cells, suggesting that this compound
246 or its analogues could be explored as antimelanoma drug candidates.

247

248 **Table 4.** Cytotoxic activity (IC₅₀) of compound (1-4) against tumor and non-malignant cell lines

Compound	IC50 (μM)			
	B16F10	NCI-H460	MCF-7	HUVEC
L2 (1)	17.17 ± 3.1	>200	>200	>200
L3 (2)	>200	>200	>200	>200
L4 (3)	>200	>200	>200	52.3 ± 8.5
Compound	IC50 (μM)			
	B16F10	A2058	A375	HUVEC
L2 (1)	17.17 ± 3.1	81.3 ± 9.5	>200	>200
L5 (4)	>200	>200	>200	>200

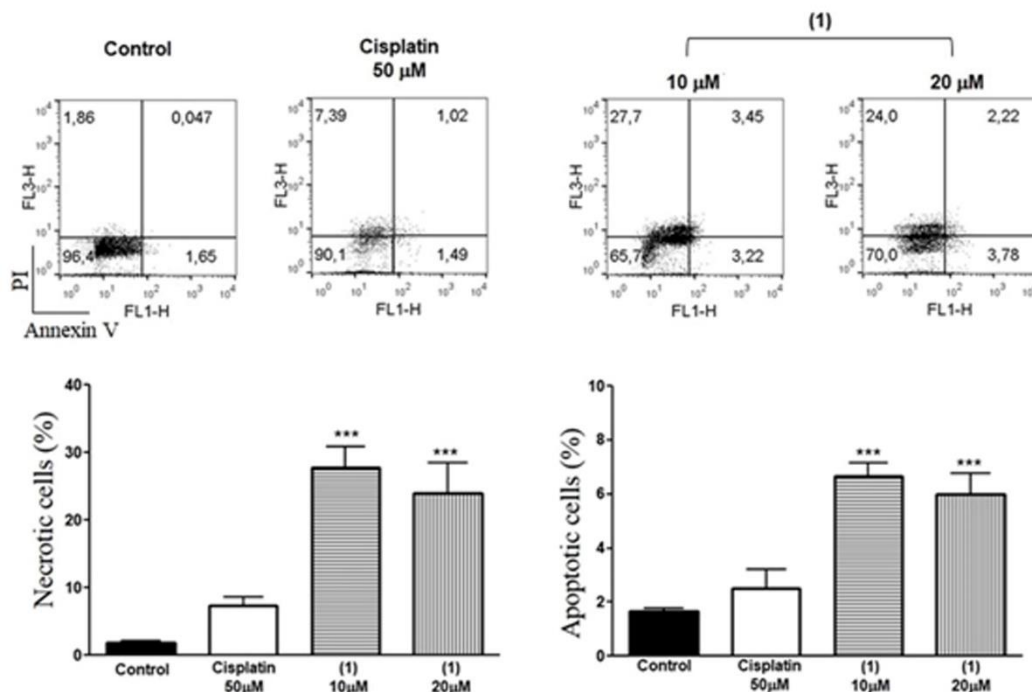
249

250

251 3.5 **1** induced necrosis in B16F10 melanoma cells

252 We further evaluated the cytotoxic effects of **1** by flow cytometry using the annexin V/PI assay.
253 The reduction of melanoma cells viability by **1** could be the result of apoptosis ~~or~~ or necrosis induction.
254 Hence, we carried the apoptosis/necrosis evaluation to examine if **1** can provoke cells death in the B16F10
255 cells. As shown in Figure 3, treatment of B16F10 cells with 10 and 20 μM of **1** induces cell death by
256 necrosis in the melanoma cells. In addition, there was an increase of B16F10 cells labeled with PI after

257 treatment with **1** indicating impairment of cell viability. Of interest, apoptosis was not an outcome of the
 258 treatment B16F10 with **1** (Figure 2). Altogether, we can suggest that **1** shows antimelanoma effects through
 259 induction of cell death by necrosis in B16F10 cells.
 260



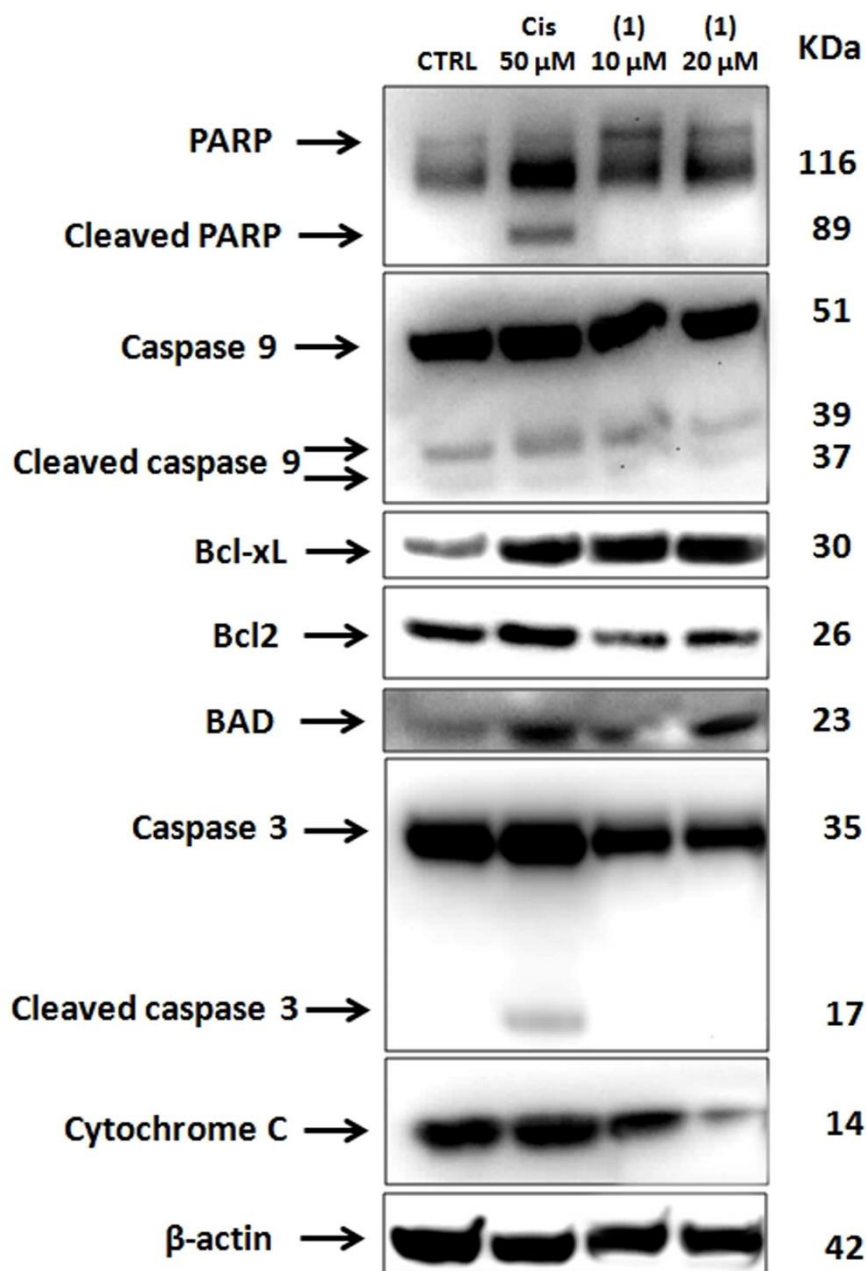
261
 262 **Figure 3.** Compound (**1**) triggered mainly necrosis in B16F10 melanoma cells. B16-F10 cells were treated
 263 for 12 h with **1** (10 and 20 μM) or cisplatin 50 μM (positive control for apoptosis), double stained with
 264 annexinV/PI and analyzed by flow cytometry (dot pots above in the figure). Percentage of necrotic cells
 265 (annexinV⁻/PI⁺) and apoptotic cells (annexinV⁺/PI⁺ and annexinV⁺/PI⁻) were considered separately.
 266 Compound (**1**) 10 and 20 μM increased both necrotic and apoptotic cellular population (***) p < 0.001
 267 versus control), although, the main cell death pathway was necrosis. All these data are mean of the
 268 percentage of positive cells ± SD (n = 3).

269

270 3.6 Reduction of Bcl-2 is a remarkable outcome of the effects of compound (1) on B16F10 melanoma cells

271 The effects of **1** on the activation of necrosis cell death were analyzed in more detail by Western
 272 blotting (Figure 4). Thus, B16F10 cells were treated for 24h with **1** and cisplatin (positive control). To
 273 investigate the molecular events initiated by the treatment with **1**, the intrinsic (mitochondrial) pathways
 274 were evaluated. The cleavage of PARP, a substrate of caspase activation was only observed in the cells
 275 treated with cisplatin (positive control). Accordingly, there was an increase in the caspase-3 activation of

276 cells treated with cisplatin. In contrast, **1** did not induce caspase-3 or -9 cleavage in B16F10 cells. However,
 277 **1** induced a decrease in the antiapoptotic protein Bcl-2, which in turn can affect the mitochondrial
 278 membrane permeability and the proapoptotic mitochondrial pathway. By the reduction of Bcl-2 expression,
 279 cells can turn more sensible to chemotherapeutic drugs. In agreement, **1** lead to increase of BAD, a
 280 proapoptotic protein, which is a regulator of mitochondrial cell permeability. Bcl-2 binds to Bax multi-
 281 domain proteins and thus blocks their proapoptotic activity. Thus, the reduction of Bcl-2 induced by **1** can
 282 unblock the antiapoptotic effects of them. Therefore, our study shows that **1** mostly likely increases the
 283 sensibility of cells to chemotherapeutic agents. Thus, **1** might be used in association with antimelanoma
 284 drugs. However, further investigation on this mechanism is needed in future studies.



286

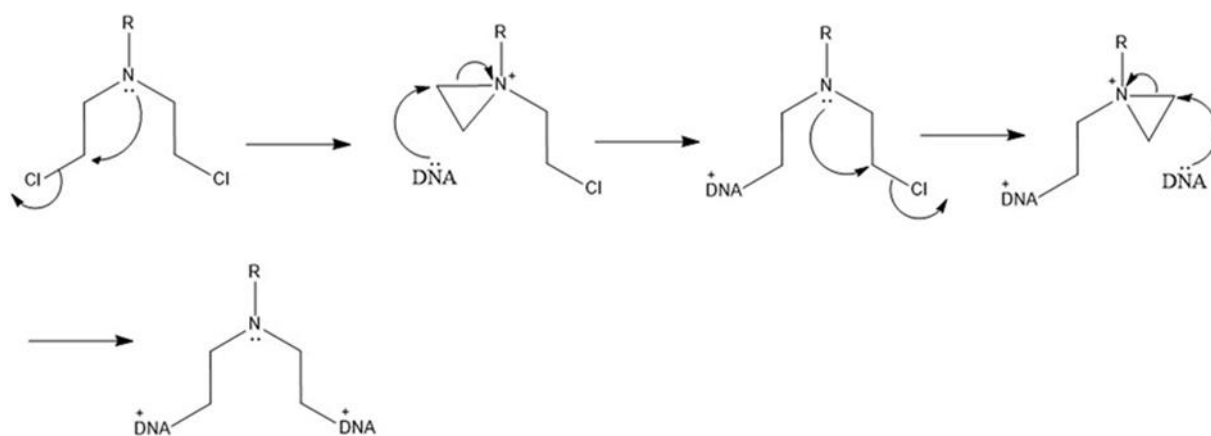
287 **Figure 4.** Compound (**1**) provoke reduction of Bcl-2 expression in B16F10 cells. Cell death proteins
288 expression was assessed after B16F10 cells treatment for 24h with **1** (10 and 20 μM) or 50 μM of cisplatin
289 (positive control to apoptosis), together with evaluation of cell lysis and Western Blot analysis. Only
290 cisplatin induced apoptotic signs: cleavage of PARP and caspase-3. **1** did not induce PARP or caspase-3 or
291 -9 cleavage. Hence, **1** showed no apoptotic feature but affected mitochondrial proteins: reduction of Bcl-2
292 associated with increased BAD expression. Western blot membrane images are representative of three
293 independent experiments.

294

295 *3.7 Theoretical investigations on the alkylating ability of the nitrogen mustard-derived Schiff base*
296 *compounds.*

297 The proposed mechanism of DNA alkylation by nitrogen mustard compounds is represented in
298 Figure 5 [29] [33]. Theoretical studies were carried out aiming to explain the reason why only **1** was able
299 to induce cytotoxic effects on melanoma cells, while all other compounds under investigation revealed to
300 be inactive.

301



302

303 **Figure 5.** Proposed mechanism of DNA alkylation by nitrogen mustard compounds (adapted from
304 reference 29 33).

305 In order to verify this hypothesis, the reaction energies for the compounds under study were
306 estimated by means of the density functional theory (DFT). Table 5 shows the reactions energies calculated
307 using different exchange/correlation functionals and basis sets.

308

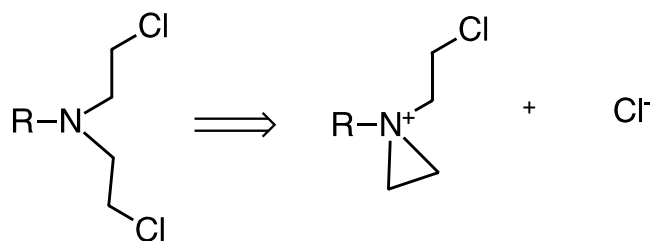
309

310 **Table 5.** Reaction energies (in kcal mol⁻¹) estimated using different exchange/correlation functionals and
311 basis sets.

Compound	B3LYP		PBE	
	D95	ccpv-dz	D95	ccpv-dz
L2 (1)	144.0	142.7	147.1	145.5
L3 (2)	145.5	144.5	147.6	147.4
L4 (3)	143.2	141.7	146.2	144.4
L5 (4)	144.3	142.5	147.8	145.7

312

313 The data shown in Table 5 indicate that the group R does not affect the reaction energies. The
314 differences are in the range of the error bars expected for the DFT calculations of about 5 kcal mol⁻¹. From
315 the thermodynamic point of view, the difference in the biological activity is not related to different
316 behaviors towards the reaction described by equation (1).



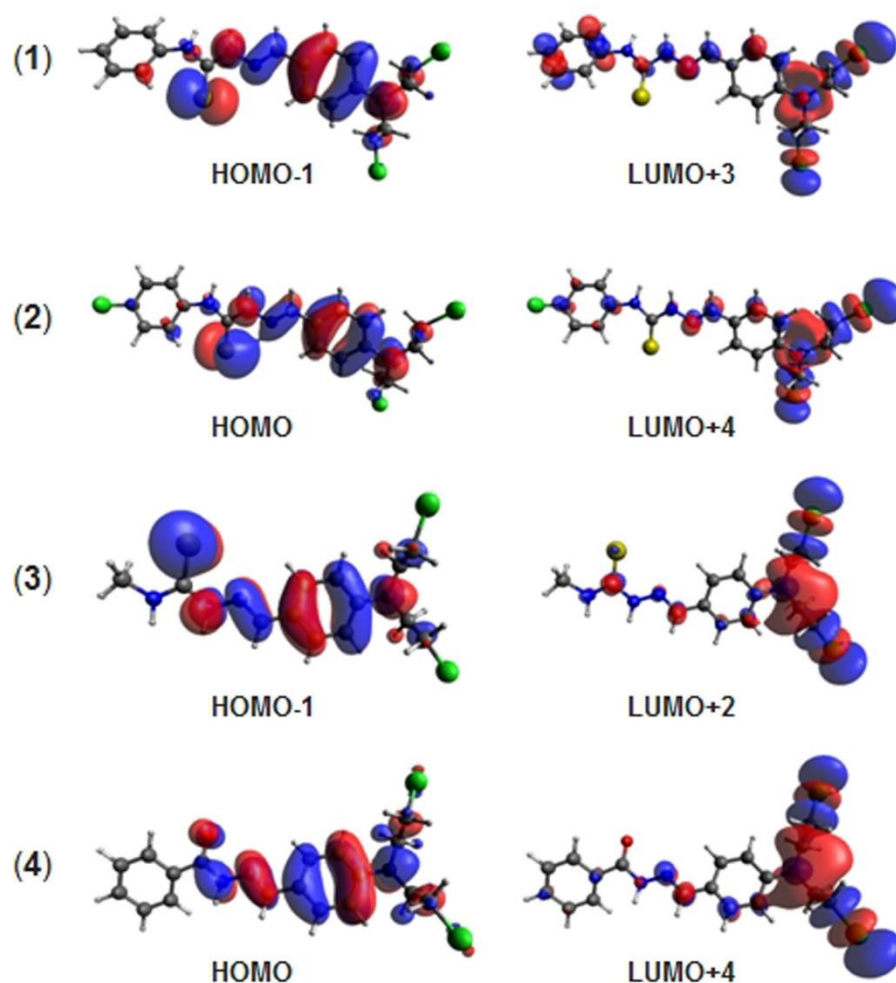
317

equation 1.

318

319 Figure 6 shows that frontier orbitals of the different compounds have similar characteristics at the
320 nitrogen mustard group. This is also good evidence that its reactivity is not affected by the presence of the
321 thiosemicarbazone/hydrazone moiety of the molecule.

322



323

324 **Figure 6.** Orbital density of the frontier electronic states calculated at the B3LYP/D95 level of theory.

325

326 One could argue that the electrophilicity of the mustard group might be the most important factor
 327 accounting for the cytotoxic activity. Therefore, we calculated the reaction energy of this group with BF₃,
 328 a typical nucleophilic species. The results shown at Table S2 Electronic Supplementary Information (ESI)
 329 indicate that the influence of the R group in the reaction energy is negligible and does not explain the
 330 distinct biological activity of (1).

331 The very small energy differences among the compounds suggest that differences in energy could
 332 not be responsible for the fact that only **1** shows cytotoxic effects while (2-4) are inactive. Hence, we may
 333 suggest that either DNA alkylation is not involved in the mechanism of action of **1** or if it does, other
 334 cellular pathways are determinant for its cytotoxic effects.

335

336 **4. Conclusions**

337 Considering the well known antitumor activities of nitrogen mustard and of several Schiff base
338 derivatives, compounds (**1-4**) were designed to contain the *bis*(2-chloroethyl)amino alkylating group
339 functionalized with a thiosemicarbazone/hydrazone moiety. In spite of the structural similarities among the
340 compounds, only (**1**) showed cytotoxic effects on melanoma cells when tested against a panel of solid tumor
341 cell lineages.

342 Differences in lipophilicity could at least in part be responsible for the distinct cytotoxic activity
343 of **1**. In fact, logP = 4.90 (**1**); 5.42 (**2**); 3.48 (**3**); 4.22 (**4**) [30] [34]. Theoretical calculations demonstrated
344 that all compounds (**1-4**) exhibit similar behaviors as DNA alkylating agents, indicating that either DNA
345 alkylation is not part of their mode of action or if it does, only (**1**) has the appropriate lipophilic character
346 to be able to cross the tumor cellular membrane. In fact, while (**2**) seems to be too lipophilic, (**3**) and (**4**)
347 are not lipophilic enough to transpose the cell membrane and reach the targets.

348 Preliminary studies on the mechanism of action of **1** revealed that this compound induces cell
349 death by necrosis in the melanoma cells and that apoptosis was not an outcome of the treatment B16F10
350 with **1**. In addition, **1** induced a decrease in the antiapoptotic protein Bcl-2, which in turn can affect the
351 mitochondrial membrane permeability. In agreement, **1** lead to an increase of the mitochondrial cell
352 permeability regulator BAD protein. Our study suggested that **1** mostly likely enhances the sensibility of
353 cells to chemotherapeutic agents by the reduction of Bcl-2 expression. Thus, **1** might be used in association
354 with antimelanoma drugs. However, further investigation on this mechanism is needed in future studies.

355

356 **Ethics approval and consent to participate**

357 Not applicable.

358

359 **Human and animal rights**

360 No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

361

362 **Consent for publication**

363 Not applicable.

364

365 **Conflict of Interest**

366 The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

367 **Acknowledgements**

368 The authors gratefully acknowledge CNPq, Capes and INCT-INOVAR (Proc. CNPq
369 573.364/2008-6) for financial support and student grants.

370

371 **Supplementary material**

372 Electronic Supplementary Information (ESI) contains the FT-IR spectra of compounds (**1-4**) as
373 well as their ¹H and ¹³C NMR spectra. It also contains data from the DFT theoretical calculations for
374 compounds (**1-4**).

375 CCDC reference numbers XXXX and xxxx contain the supplementary crystallographic data for **2**
376 and **4**. These data can be obtained free of charge from the CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

377

378

379 **References**

380 1. Fanelli, M.; Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M.; Paoli, P. New trends in platinum and
381 palladium complexes as antineoplastic agents. *Coord. Chem Rev.*, **2016**, *310*, 41-79.

382 2. Stéphane, P.; Montaudon, D.; Pourquier, P. From old alkylating agents to new minor groove binders.
383 *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2014**, *89*, 43–61.

384 3. Povirk, L.F.; Shuker, D.E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat. Res.*,
385 **1994**, *318*, 205-226.

386 4. Stornetta, A.; Zimmermann, M.; Cimino, G.D.; Henderson, P.T.; Sturla, S.J. DNA Adducts from
387 Anticancer Drugs as Candidate Predictive Markers for Precision Medicine. *Chem. Res. Toxicol.*, **2017**,
388 *30*(1), 388-409.

389 5. Beraldo, H.; Gambino, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones,
390 Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4*(1), 31-39.

391 6. Floyd, A.B.; Brock, A.; Gonzalez-Sarrías, A.; Navindra, P.S. Cytotoxic gallium complexes containing
392 thiosemicarbazones derived from 9-anthraldehyde: Molecular docking with biomolecules. *J. Mol. Struct.*,
393 **2016**, *1121*, 156-166.

394 7. Tarlok, S. L.; Sharma, R.; Bawa, G.; Khanna, S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone
395 derivatives of metals - An overview. *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, *253*(7-8), 977-1055.

396

397 8. Moldovan, C.M.; Oniga, O.; Pârnu, A.; Tipericiuc, B.; Verite, P.; Pîrnau, A.; Crisan, O.; Bojita, M.; Pop,
398 R. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of some new acyl-hydrazones bearing 2-aryl-thiazole. *Eur.*
399 *J. Med. Chem.*, **2011**, *46*(2) 526-534.

400 9. Singh, N.; Ranjana, R.; Kumari, M.; kumar, B. A Review on Biological Activities of Hydrazone
401 Derivatives. *Int. J. Pharm. Clin. Res.*, **2016**, *8*(3) 162-166.

402 10. Recio-Despaigne, A.A.; Parrilha, G.L.; Izidoro, J.B.; Da Costa, P.R.; Dos Santos, R.G.; Piro, O.E.;
403 Castellano, E.E.; Rocha, W.R.; Beraldo, H. 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones
404 and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *50*, 163-
405 172.

406 11. Ferreira, I. P.; Piló, E.D.L.; Recio-Despaigne A.A.; Da Silva, J.G.; Ramos, J.P.; Marques, L.B.;
407 Prazeres, P.H.D.M.; Takahashi, J.A.; Souza-Fagundes, E.M.; Rocha, W.; Beraldo, H. Bismuth(III)
408 complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones: Antimicrobial and cytotoxic
409 activities and effects on the clonogenic survival of human solid tumor cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**,
410 *24*(13), 2988-2998.

411 12. Lessa, J.A.; Mendes, I.C.; Da Silva, P.R.O.; Soares, M.A.; Dos Santos, R.G.; Speziali, N.L.; Romeiro,
412 N.C.; Barreiro, E.J.; Beraldo, H. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxic activity in nanomolar
413 doses against malignant gliomas. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*(12), 5671-5677.

414 13. Soares, M.A.; Lessa, J.A.; Mendes, I.C.; Da Silva, J.G.; Dos Santos, R.G.; Salum, L.B.; Daghestani,
415 H.; Andricopulo, A.D.; Day, B.W.; Vogt, A. N⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones:
416 Cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the
417 mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*(11), 3396-3409.

418 14. De Oliveira, J.F.; Lima, T.S.; Vendramini-Costa, D.B.; Pedrosa, S.C.B.L.; Lafayette, E.A.; Da Silva,
419 R.M.F.; De Almeida, S.M.V.; De Moura, R.O.; Ruiz, A.L.T.G.; De Carvalho, J.E.; De Lima, M.C.A.
420 Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of
421 antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. *Eur. J. Med. Chem.*,
422 **2017**, *136*, 305-314.

423 15. Shebl, M. Coordination behavior of new bis(tridentate ONO, ONS and ONN) donor hydrazones towards
424 some transition metal ions: Synthesis, spectral, thermal, antimicrobial and antitumor studies. *J. Mol. Struct.*,
425 **2017**, *1128*, 79-93.

426

427 16. Chang, Hui-Qin; Jia, L.; Xua, J.; Xua, Zou-Qing; Chen, Ru-Hua; Wua, Wei-Na; Bie, Hong-Yan; Zhu,
428 Tao-Feng; Ma, Tie-liang; Wang, Y. Syntheses, characterizations, antitumor activities and cell apoptosis
429 induction of Cu(II), Zn(II) and Cd(II) complexes with hydrazone Schiff base derived from
430 isonicotinohydrazide. *Inorg. Chem. Comm.*, **2015**, *57*, 8–10.

431 17. Oxford Diffraction, CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (Release 20-01-
432 2012 CrysAlis171.NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England, **2010**.

433 18. Dolomanov, O.V.; Bourhis, L.J.; Gildea, R.J.; Howard, J.A.K.; Puschmann, H. OLEX2: a complete
434 structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Cryst.*, **2009**, *42*, 339-341.

435 19. Sheldrick, G.M. SHELXT-Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Cryst. A*,
436 **2015**, *71*, 3-8.

437 20. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst. A*, **2008**, *64*, 112-122.

438 21. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani,
439 G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko,
440 B.G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H.P.; Ortiz, J.V.; Izmaylov, A.F.; Sonnenberg, J.L.; Williams-
441 Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe,
442 D.; Zakrzewski, V.G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda,
443 R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.;
444 Montgomery Jr. J.A.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.J.; Brothers, E.; Kudin, K.N.;
445 Staroverov, V.N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.C.;
446 Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J.M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J.W.;
447 Martin, R.L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J.B.; Fox, D.J. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian,
448 Inc.: Wallingford, CT, USA, **2016**.

449 22. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*,
450 **1993**, *98*, 5648-5652.

451 23. Lee, C.T.; Yang, W.T.; Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a
452 functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785-789.

453 24. Perdew, J.P., Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev.*
454 *Lett.*, **1996**, *77*, 3865-3868.

455 25. Perdew, J.P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple [Phys. Rev.
456 *Lett.* *77*, 3865 (1996)]. *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, *78*, 1396-1396.

457 26. Dunning, T.H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron
458 through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.*, **1989**, *90*, 1007-1023.

459 27. Woon, D. E. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. III. The atoms aluminum
460 through argon. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 1358-1371.

461 28. Sankaraperumal, A.; Karthikeyan, J.; Shetty, A.N. Molecular structure and conformation study of p-
462 [N,N-bis(2-Chloroethyl)amino] benzaldehyde-4-phenyl thiosemicarbazone. *J. Struct. Chem.*, **2012**, *53*(5),
463 932-937.

464 29. Sankaraperumal, A.; Karthikeyan, J.; Shetty, A.N.; Lakshmisundaram, R. Nickel(II) complex of p-
465 [N,N-bis(2-chloroethyl)amino]benzaldehyde-4-methyl thiosemicarbazone: Synthesis, structural
466 characterization and biological application. *Polyhedron*, **2013**, *50*(1), 264-269.

467 30. Garcia, C.V.; Parrilha, G.L.; Rodrigues, B.L.; Barbeira, P.J.S.; Clarke, R.M.; Storr, T.; Beraldo, H.
468 Cobalt(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived Schiff bases: Studies investigating ligand release upon
469 reduction. *Polyhedron*, **2017**, *124*, 86-95.

470 31. Beraldo, H.; Lima, R.; Teixeira, L.R.; Moura, A.A.; West, D.X. Crystal structures and IR, NMR and
471 UV spectra of 4-formyl- and 4-acetylpyridine N(4)-methyl- and N(4)-ethylthiosemicarbazones. *J. Molec.*
472 *Struct.*, **2001**, *559*(1-3), 99-106.

473 32. Piló, E.D.L.; Recio-Despaigne, A.A.; Da Silva, J.G.; Ferreira, I.P.; Takahashia, J.A.; Beraldo, H. Effect
474 of coordination to antimony(III) on the antifungal activity of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-
475 derived hydrazones. *Polyhedron*, **2015**, *97*, 30-38.

476 33. Rajska, S.R.; William, R.M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*(8),
477 2723-2796.

478 34. Virtual Computational Chemistry Laboratory: ALOGPS 2.1 software www.vcclab.org/lab/alogps/
479 (Accessed January 16, 2018).

480

481