



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Raquel dos Santos Amim

**Síntese, caracterização e potencial citotóxico e antituberculose de
tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), bismuto(III),
antimônio(III) e de bases de Schiff derivadas de
p-nitrofeniletilenodiamina**

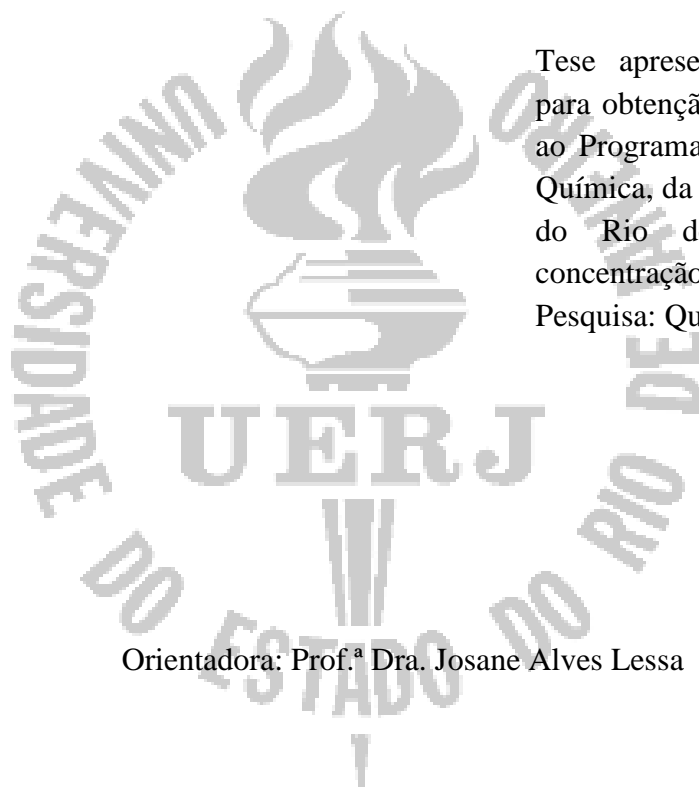
Rio de Janeiro

2017

Raquel dos Santos Amim

Síntese, caracterização e potencial citotóxico e antituberculose de tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), bismuto(III), antimônio(III) e de bases de Schiff derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química. Linha de Pesquisa: Química Inorgânica.



Orientadora: Prof.^a Dra. Josane Alves Lessa

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

A517 Amin, Raquel dos Santos
Síntese, caracterização e potencial citotóxico e antituberculose de tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), bismuto(III), antimônio(III) e de bases de Schiff derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina./ Raquel dos Santos Amin – 2017.

146 f.

Orientador: Josane Alves Lessa

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Síntese orgânica– Teses. 2. Complexo metálico – Teses. 3. Tuberculose – Teses I. Lessa, Josane Alves II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

CDU 543.2

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Raquel dos Santos Amim

Síntese, caracterização e potencial citotóxico e antituberculose de tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), bismuto(III), antimônio(III) e de bases de Schiff derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química. Linha de Pesquisa: Química Inorgânica.

Aprovada em 23 de janeiro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Josane Alves Lessa (Orientadora)

Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr.^a. Nakédia Maysa Freitas Carvalho

Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Lippy Faria Marques

Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Maurício Lanznaster

Departamento de Química - UFF

Prof. Dr.^a. Annelise Casellato

Instituto de Química - UFRJ

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTO

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Instituto de Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À orientadora deste trabalho, Josane Alves Lessa, pela orientação, dedicação, apoio, paciência e conselhos.

Ao professor Marcus Vinicius Nora de Oliveira pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela colaboração nos testes biológicos.

À professora Mônica Regina Marques pela realização das análises de RMN .

Aos professores e funcionários do Instituto de Química-UERJ.

Aos colegas de laboratório Gisele, Stephanie, Natália, Renata, Wallace, pela troca de informações, pela convivência e amizade durante todo o tempo de doutorado.

À Denise, funcionária do Departamento de Química, pelas conversas, risadas e conselhos.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

AMIM, R.S. *Síntese, caracterização e potencial citotóxico e antituberculose de tiossemicarbazonas, seus complexos de gálio(III), bismuto(III), antimônio(III) e de bases de Schiff derivadas de p-nitrofeniletilenodiamina*. 2017. 202f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

No presente trabalho é descrita a síntese de tiossemicarbazonas (TSCs) derivadas de pirazinamida, seus complexos metálicos de Ga^{3+} , Bi^{3+} e Sb^{3+} e de bases de Schiff derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina. Esses compostos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar seu potencial como protótipos de fármacos antituberculose e/ou antitumoral. Nesse contexto, foram preparados 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona (HPzAm4DH, **1**) e seus derivados substituídos em N^4 por metil (HPzAm4M, **2**), etil (HPzAm4E, **3**), cicloexil (HPzAm4Cex, **4**), fenil(HPzAm4Ph, **5**), cujos dados de pontos de fusão, espectroscopias no IV e de RMN e espectrometria de massas com ionização por *electrospray*(ESI-MS) confirmaram sua pureza e obtenção. A partir das tiossemicarbazonas foram obtidos novos complexos com os íons metálicos de interesse. Os complexos de Ga^{3+} (**6–10**) foram obtidos à partir da proporção TSC:nitrato de gálio(III) (2:1) e apresentam estrutura geral $[\text{Ga}(\text{L})_2]\text{NO}_3$, onde L^- corresponde à TSC desprotonada. Os complexos de Bi^{3+} (**11–15**) e os de Sb^{3+} (**16–20**) foram obtidos à partir de TSC e cloreto metálico na proporção 1:1 e apresentam estrutura geral $[\text{M}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (onde $\text{M} = \text{Bi}^{3+}$ ou Sb^{3+}). Os complexos metálicos foram caracterizados, quando possível, por ponto de fusão, condutivimetria, espectroscopias no IV, eletrônica e de RMN e espectrometria de massas. Foi investigada a ação biológica de todos os compostos. Das tiossemicarbazonas sintetizadas, nenhuma teve atividade significativa contra as células tumorais HCT–116 (adenocarcinoma de colon), OVCAR–8 (câncer de ovário) e SF–295 (glioblastoma multiforme) a $5\mu\text{g}/\text{mL}$ e contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, a principal espécie de bactéria causadora de tuberculose, na concentração máxima de $100\mu\text{g}/\text{mL}$. Complexos de Ga^{3+} (**7–10**) não demonstraram efeitos citotóxicos significativos contra as linhagens de células tumorais, com exceção do composto (**9**), o qual foi mais citotóxico às linhagens MCF–7, PC3 e HCT–116 quando comparados com os fármacos de referência cisplatina e etoposídeo. Em geral, a atividade desses complexos contra bactéria *M. tuberculosis* é melhor que a das tiossemicarbazonas não coordenadas, confirmando que a coordenação ao Ga^{3+} resultou em compostos mais potentes contra essa bactéria. Os complexos de Bi^{3+} (**11–15**) não apresentaram atividade significativa contra as células tumorais testadas como também contra *M. tuberculosis*. Os complexos de Sb^{3+} investigados (**16–20**) não apresentaram atividade contra as células tumorais em estudo. No entanto, a coordenação a Sb^{3+} levou ao aumento significativo de atividade contra *M. tuberculosis*, sobretudo para os complexos **17**, **18** e **19**, os quais apresentaram concentração inibitória mínima de $25\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram sintetizadas ainda 12 moléculas contendo o grupo *p*-nitrobenzeno (**21–32**), que foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, RMN e ESI-MS. Dentre os compostos, destacaram-se **21**, **29**, **30** e **32** que inibiram em mais de 90% o crescimento de células HCT–116. Todos os compostos mostraram-se inativos contra *M. tuberculosis* nas concentrações testadas, com exceção de **24** e **29**.

Palavras-chave: Tiossemicarbazona. Pirazinamida. Complexo metálico. Bases de Schiff. Atividade citotóxica. Tuberculose.

ABSTRACT

AMIM, R.S. *Synthesis, characterization, and cytotoxic and antituberculosis potential of thiosemicarbazones, their gallium(III), bismuth(III), antimony(III) complexes and Schiff bases derived from p-nitrophenylethylenediamine*. 2017. 202f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

In the present work we describe the synthesis of thiosemicarbazones (TSCs) derived from pyrazinamide, its metal complexes of Ga^{3+} , Bi^{3+} and Sb^{3+} as well as *p*-nitrophenylethylenediamine-derived Schiff bases. These compounds have been developed in order to investigate their potential as prototypes of antituberculosis and/or antitumor drugs. In this context, 2-pyrazineformamide thiosemicarbazone (HPzAm4DH, **1**) and its derivatives substituted at N^4 by methyl (HPzAm4M, **2**), ethyl (HPzAm4E, **3**), cyclohexyl (HPzAm4Cex, **4**) and phenyl (HPzAm4Ph, **5**) were prepared, whose data of melting point, IR and NMR spectroscopies and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) confirmed its purity and yield. Novel complexes were obtained with the thiosemicarbazones and the metal ions of interest. The Ga^{3+} complexes (**6–10**) have been prepared from TSC and gallium nitrate in the 2:1 ratio and exhibit the general formula $[\text{Ga}(\text{L})_2]\text{NO}_3$, where L is the anionic thiosemicarbazone. Bi^{3+} (**11–15**) and Sb^{3+} (**16–20**) complexes have been prepared from TSC and metal chloride (1:1 ratio) and showed the general formula $[\text{M}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (where $\text{M} = \text{Bi}^{3+}$ ou Sb^{3+}). All complexes were characterized, when possible, by melting point, conductimetry, IR, electronic and NMR spectroscopies as well as ESI-MS. The biological action of all compounds has been investigated. The TSC haven't exhibit action against the tumor cell lines HCT-116 (colon adenocarcinoma), OVCAR-8 (ovarian cancer) and SF-295 (glioblastoma multiforme) at $5\mu\text{g/mL}$ and against *Mycobacterium tuberculosis* strain, the main bacterial species causing tuberculosis, in the concentration maximum of $100\mu\text{g/mL}$. Ga^{3+} complexes (**7–10**) don't demonstrate significant cytotoxic effects against the tumor cell lines, except compound (**9**), which is more cytotoxic to MCF-7, PC3 and HCT-116 cells when compared to the reference drugs cisplatin and etoposide. In general, the activity of these complexes against *M. tuberculosis* bacteria is better than the free thiosemicarbazones, confirming that Ga^{3+} coordination resulted in compounds more potent against this bacterium. Bi^{3+} complexes (**11–15**) have not shown significant activity against the tumor cells tested as well as against *M. tuberculosis*. The investigated Sb^{3+} complexes (**16–20**) also have not shown activity against the tumor cells under study. Nonetheless, coordination to Sb^{3+} led to a significant increase in activity against *M. tuberculosis*, especially for complexes **17**, **18** and **19**, which show a minimum inhibitory concentration of $25\mu\text{g/mL}$. Twelve molecules containing the *p*-nitrobenzene group (**21–32**) have also been synthesized and characterized by IR and NMR spectroscopies as well as ESI-MS. Among the compounds, **21**, **29**, **30** and **32** inhibit the growth of HCT-116 cells by more than 90%. All compounds were inactive against *M. tuberculosis* at the concentrations tested, with the exception of **24** and **29**.

Keywords: Thiosemicarbazone. Pyrazinamide. Metal complex. Schiff basis. Cytotoxic activity. Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Composto antineoplásico da classe das mostardas nitrogenadas.....	21
Figura 2-	Estrutura do fármaco antitumoral cis-[PtCl ₂ (NH ₃) ₂], cisplatina.....	21
Figura 3-	Estruturas de daunorrubicina (a) e doxorrubicina(b).....	22
Figura 4-	Primeiro fármaco eficaz contra Mycobacterium tuberculosis.....	23
Figura 5-	Estruturas dos principais fármacos utilizados atualmente contra tuberculose.....	24
Figura 6-	Fármaco antimicrobiano Salvarsan.....	25
Figura 7-	Histórico de alguns complexos metálicos citotóxicos que foram aprovados ou entraram em ensaio clínico.....	25
Figura 8-	Estrutura genérica das tiossemicarbazonas.....	27
Figura 9-	Alguns modos de coordenação das tiossemicarbazonas.....	27
Figura 10-	Composto (4-bromofenil)(fenil)metanona N-(5-ciclobutil-1,3-oxazol-2-il) tiossemicarbazona.....	28
Figura 11-	Estruturas de complexos antitumorais de gálio(III) em fase clínica.....	30
Figura 12-	Efeito do complexo de gálio(III) com 7-cloroquinolina 2-acetilpiridinátiossemicarbazona e do fármaco etoposídeo sobre as linhagens de células cancerosas HCT-116, Caco-2, HT-29 e CCD-18Co após 24, 48 e 72 h de tratamento.....	31
Figura 13-	Estrutura química do complexo de bismuto(III) [Bi(2-acetilpiridina N(4)-feniltiossemicarbazonato)(NO ₃) ₂ (CH ₃ CH ₂ OH)].....	33
Figura 14-	Estrutura molecular do composto [Sb(2Ac4oClPh)Cl ₂].....	34
Figura 15-	Mecanismo proposto para condensação de compostos carbonílicos e aminas primárias, catalisada por ácido, formando iminas.....	35
Figura 16-	Representação da estrutura do Salen.....	35
Figura 17-	Estruturas moleculares de alguns fármacos antineoplásicos contendo grupamentos C=N (1) citarabina; (2) 6-tioguanina; (3) letrozol.....	36
Figura 18-	Esquema das sínteses dos compostos sintetizados neste trabalho.....	41
Figura 19-	Esquema de preparo da tiossemicarbazida.....	42
Figura 20-	Esquema de síntese das tiossemicarbazonas.....	43
Figura 21-	Esquema de síntese dos complexos de gálio(III) com tiossemicarbazonas de interesse.....	44

Figura 22-	Esquema de síntese dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) com tiossemicarbazonas derivadas de pirazinamida.....	45
Figura 23-	Esquema de obtenção do composto <i>p</i> -nitrofeniletilenodiamina (21).....	46
Figura 24-	Esquema para a reação de obtenção de <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -bis(4-nitrofenil)etano-1,2-diamina (22).....	46
Figura 25-	Esquema de obtenção das iminas derivadas de <i>p</i> -nitrofeniletilenodiamina.....	47
Figura 26-	Estrutura química das iminas sintetizadas.....	47
Figura 27-	Estruturas das tiossemicarbazonas sintetizadas.....	51
Figura 28-	Mecanismo de reação de formação das tiossemicarbazonas.....	52
Figura 29-	Possíveis formas tautoméricas tiol/tionadastiossemicarbazonas.....	53
Figura 30-	Espectro no IV de <i>N</i> ⁴ -metil tiossemicarbazida e da tiossemicarbazona HPzAm4M (2), obtidos em pastilha de KBr (4000–400cm ⁻¹).....	54
Figura 31-	Espectros eletrônicos de HPzAm4Ph (5) em dimetilformamida (concentração= 5,5x10 ⁻⁵ molL ⁻¹ a 1,1x10 ⁻⁵ molL ⁻¹).....	55
Figura 32-	Numeração utilizada para atribuição dos átomos de hidrogênio e de carbono das tiossemicarbazonas e seus isômeros configuracionais <i>E</i> e <i>Z</i> ..	56
Figura 33-	Espectro de RMN de ¹ H de HPzAm4DH (1), obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	57
Figura 34-	Espectro de RMN de ¹³ C de HPzAm4Ph (5), obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ , ampliado na região entre 115 e 190 ppm.....	57
Figura 35-	Espectro de massas (ESI-MS) em metanol de HPzAm4Ph, obtido no modo negativo.....	60
Figura 36-	Diagrama de Ortep de HPzAm4E (2).....	61
Figura 37-	Ligação de hidrogênio do composto HPzAm4E (2) ao longo do eixo b....	61
Figura 38-	Espectros no infravermelho a) da tiossemicarbazona HPzAm4M (2) e b) do complexo [Ga(PzAm4M)Cl ₂] NO ₃ (7), obtidos em KBr, na região de 4000–400cm ⁻¹	68
Figura 39-	Espectro eletrônico de HPzAm4E (3) e [Ga(PzAm4E) ₂]·2H ₂ O (8) (a) e curva de absorvância <i>versus</i> concentração de 8, usada para determinação de ε (b).....	69
Figura 40-	Estrutura de íon complexo de gálio(III) com tiossemicarbazona: [Ga(L) ₂]NO ₃ (L=2-acetilpiridina <i>N</i> ⁴ -metil tiossemicarbazonato).....	70
Figura 41-	Esquema de numeração para os espectros de ressonância magnética	

	nuclear de ^1H	70
Figura 42-	Espectros de RMN de ^1H de A) HPzAm4E (3) e B) $[\text{Ga}(\text{PzAm4E})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8) em $\text{DMSO-}d_6$	74
Figura 43-	Espectros de RMN de ^{13}C de A) HPzAm4E e B) $[\text{Ga}(\text{PzAm4E})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8)em $\text{DMSO-}d_6$	76
Figura 44-	Espectro de RMN de ^1H de Produto (6)obtido em $\text{DMSO-}d_6$. Ampliação entre 6,0 e 10,0ppm.....	77
Figura 45-	Espectro de RMN de ^{13}C do produto (6).....	77
Figura 46-	Tipos de ciclização da tiossemicarbazona HPzAm4DH (1).....	78
Figura 47-	Reação de ciclização do ligante HPzAm4DH.....	78
Figura 48-	EspectroESI–MS de $[\text{Ga}(\text{PzAm4Cex})\text{Cl}_2]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (9), obtido no modo positivo.....	80
Figura 49-	Porcentagem de viabilidade celular das tiossemicarbazonas, seus complexos (7-10), pirazinamida (PZA), nitrato de gálio (NGA) contra linhagens de células MCF7, PC3, HCT–116, HL–60.....	81
Figura 50-	Espectros no IV da tiossemicarbazona HPzAm4M (a) e do complexo $[\text{Bi}(\text{PzAm4M})\text{Cl}_2]$ (b), respectivamente, obtidos em pastilha de KBr ($4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$).....	88
Figura 51-	Espectro eletrônico de HPzAm4Cex (4) e $[\text{Bi}(\text{PzAm4Cex})\text{Cl}_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ para (14)(b).....	90
Figura 52-	Espectros ampliados (8 a10 ppm) de RMN de ^1H em $\text{MeOD-}d_4$ de A) HPzAm4DH (4), e B) $[\text{Bi}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (11).....	92
Figura 53-	Espectro de massas (ESI-MS) de $[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$ (13), obtido em metanol no modo negativo.....	93
Figura 54-	Perfil isotópico para íon $[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]^+$	94
Figura 55-	Espectro no IV da tiossemicarbazona HPzAm4E (a) e do complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$ (b), respectivamente, obtidos em pastilha de KBr ($4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$).....	101
Figura 56-	Espectro ampliados (6 a 11 ppm) de RMN ^{13}H de em $\text{DMSO-}d_6$ de HPzAm4DH (1) e do complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (16).....	102
Figura 57-	Espectro de RMN ^{13}C de sólido de HPzAm4E e do complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$	103
Figura 58-	Espectro ESI-MS de $[\text{Sb}(\text{PzAm4Ph})\text{Cl}_2]$ em metanol, obtido no modo	

	positivo.....	105
Figura 59-	Mecanismo de reação de formação de iminas.....	109
Figura 60-	Numeração utilizada para atribuição dos átomos de hidrogênio e de carbono das aminas e iminas.....	111
Figura 61-	Espectro de RMN de ^1H da base de Schiff 31, obtido em DMSO- d_6	111
Figura 62-	Espectro de RMN de ^{13}C da base de Schiff(31), obtido em DMSO- d_6	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Algumas classes de quimioterápicos antineoplásicos usados na prática clínica e seus mecanismos de ação.....	20
Tabela 2-	Tipo de eletrólito para soluções 10^{-3} mol L ⁻¹ em dimetilformamida e metanol.....	38
Tabela 3	Cores, temperaturas de fusão, massas molares e rendimentos de reações para as tiossemicarbazonas.....	53
Tabela 4-	Principais bandas no IV (cm ⁻¹) da 2-pirazinaformamida tiossemicarbazona e seus derivados N(4)- H, CH ₃ , CH ₂ CH ₃ , C ₆ H ₁₁ , C ₆ H ₅	54
Tabela 5-	Atribuição (A), número de hidrogênios (N ^o), deslocamento químico (δ), multiplicidade ^a , constante de acoplamento (J,Hz) dos sinais de RMN de ¹ H das tiossemicarbazonas 1–5.....	58
Tabela 6-	Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹³ C das tiossemicarbazonas 1–5	59
Tabela 7-	Dados de ESI–MS para o íon molecular das tiossemicarbazonas 1–5.....	59
Tabela 8-	Distâncias de ligação selecionadas (Å) de HPzAm4E (2)	62
Tabela 9-	Ângulos de ligação selecionados (°) de HPzAm4E (2)	62
Tabela 10-	Parâmetros de ligação de hidrogênio em HPzAm4E (2).....	62
Tabela 11-	Inibição do crescimento de células tumorais causada pelas tiossemicarbazonas 1–5.....	63
Tabela 12-	Avaliação da atividade antimicrobacteriana das tiossemicarbazonas 1–5....	64
Tabela 13-	Rendimento (R), ponto de fusão ^a , massa molar (MM), análise elementar ^b e condutividade molar ^c (DMF, 1×10^{-3} mol L ⁻¹) dos complexos de gálio(III).....	66
Tabela 14-	Principais bandas no IV (cm ⁻¹) dos complexos de gálio(III)	67
Tabela 15-	Bandas ^a observadas nos espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas e complexos de gálio(III) em DMF e seus respectivos valores de ε.....	69
Tabela 16-	Atribuição (A), número de hidrogênios (N ^o), deslocamento químico (δ), multiplicidade ^a , J (Hz) dos sinais de RMN de ¹ H das tiossemicarbazonas 1–5 de seus complexos de gálio(III) (6–10).....	72
Tabela 17-	Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de	

	¹³ C das tiossemicarbazonas(1–5) e dos complexos de gálio(III) (6-10)...	75
Tabela 18-	Sinal mais significativo dos espectros de massas para os complexos de gálio(III).....	79
Tabela 19-	Efeito citotóxico (CI50) (μM) contra células MCF-7, HCT-116 e HL-60 e VERO da tiossemicarbazona (5) e o complexo de gálio(III) (9) .	82
Tabela 20-	Avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos de gálio(III) em comparação com as tiossemicarbazonas livres, nitrato de gálio e pirazinamida (PZA).....	83
Tabela 21-	Atividade <i>in vitro</i> ^a dos complexos 7-10 , suas respectivas tiossemicarbazonas livres, do sal Ga(NO ₃) ₃ e do fármaco pirazinamida (PZA)contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	83
Tabela 22-	Rendimento (R), ponto de decomposição ^a , massa molar (MM), análise elementar ^b (C, H e N) e condutividade molar ^c (em metanol) dos complexos de bismuto(III).....	86
Tabela 23-	Principais bandas no IV (cm ⁻¹) das tiossemicarbazonas e dos complexos de bismuto(III).....	87
Tabela 24-	Bandas ^a observadas nos espectros eletrônicos em metanol das tiossemicarbazonas e complexos de bismuto(III)e seus respectivos valores de ε.....	89
Tabela 25-	Atribuição (A), número de hidrogênios (N ^o), deslocamento químico (δ), multiplicidade ¹ , J (Hz) dos sinais de RMN de ¹ H das tiossemicarbazonas 1–5 e dos complexos de bismuto(III) 11-15 , obtidos à partir de seus espectros em metanol deuterado.....	91
Tabela 26-	Sinais mais significativos dos espectros de massas (ESI-MS) para os complexos de bismuto(III) e suas respectivas atribuições.....	93
Tabela 27-	Avaliação da atividade citotóxica das tiossemicarbazonas e dos complexos de bismuto(III).....	95
Tabela 28-	Avaliação da atividade antimicobacteriana dos complexos de bismuto(III) em comparação com as tiossemicarbazonas livres, o sal BiCl ₃ e pirazinamida (PZA)	96
Tabela 29-	Atividade <i>in vitro</i> ^a dos complexos 11-15 , suas respectivas tiossemicarbazonas livres, do sal BiCl ₃ e do fármaco pirazinamida (PZA) contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv suscetíveis a ambas rifampicina e	

	isoniazida	97
Tabela 30-	Rendimento (R), ponto de fusão, massa molar (MM), análise elementar (C, H e N) ^a e condutividade molar (DMF, 1x10 ⁻³ mol L ⁻¹) dos complexos de antimônio(III).....	99
Tabela 31-	Principais bandas no IV (cm ⁻¹) dos complexos de antimônio(III) 16–20 , em comparação com as tiossemicarbazonas 1–5	100
Tabela 32-	Dados de ESI–MS para os complexos de antimônio(III)	104
Tabela 33-	Avaliação da atividade citotóxica das tiossemicarbazonas e dos complexos de antimônio(III), em comparação com o sal SbCl ₃ e pirazinamida (PZA).....	106
Tabela 34-	Avaliação da atividade antimicobacteriana dos complexos de antimônio(III) em comparação com as tiossemicarbazonas (1–5), SbCl ₃ e pirazinamida (PZA).....	107
Tabela 35-	Atividade <i>in vitro</i> ^a dos complexos 16–20 , suas respectivas tiossemicarbazonas livres, do sal SbCl ₃ e do fármaco pirazinamida(PZA) contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv suscetíveis a ambas rifampicina e isoniazida.....	107
Tabela 36-	Principais bandas no IV (cm ⁻¹) das aminas e bases de Schiff derivadas da <i>p</i> -nitrofeniletlenodiamina.....	110
Tabela 37-	Atribuição (A), número de hidrogênios (N ^o), deslocamento químico (δ), multiplicidade ^a , J (Hz) dos sinais de RMN de ¹ H das aminas e iminas derivadas da <i>p</i> -nitrofeniletlenodiamina.....	113
Tabela 38-	Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ¹³ C das aminas e bases de Schiff (21–32).....	114
Tabela 39-	Dados de ESI–MS para <i>p</i> -nitrofeniletlenodiamina (21) e seus derivados (22–32).....	115
Tabela 40-	Avaliação da atividade citotóxica de 21 , 22 e das bases de Schiff (23–32) frente a HCT–116, OVCAR–8 e SF–295	116
Tabela 41-	Avaliação da atividade antimicobacteriana das aminas e bases de Schiff	117
Tabela 42-	Atividade <i>in vitro</i> ^a das aminas e bases de Schiff contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPzAm4DH	pirazinoformamida-tiossemicarbazona
HPzAm4M	<i>N</i> (4)-metil-pirazinoformamida-tiossemicarbazona
HPzAm4E	<i>N</i> (4)-etil-2-pirazinoformamida-tiossemicarbazona
HPzAm4Cex	<i>N</i> (4)-ciclohexil-pirazinoformamida
HPzAm4Ph	<i>N</i> (4)-fenil-pirazinoformamida
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DMF	Dimetilformamida
M.M.	Massa molar
RMN de ¹³ C	Ressonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonancia Magnética Nuclear de Hidrogênio
M	Multiplicidade
t	triplete
s	simpleto
d	duplete
dd	duplo duplete
q	quarteto
m	multipleto
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica aguda
HCT-116	Linhagem de células de carcinoma colorretal humano
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma de mama
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
PC3	Linhagem de células de câncer de prostata humano
VERO	Linhagem de células renais de macaco
CIM	Concentração inibitória mínima
CI ₅₀	Concentração de composto que inibe em 50% a proliferação celular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	19
1.1	Objetivo Geral	19
1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3	PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1	Materiais	37
3.1.1	<u>Solventes</u>	37
3.1.2	<u>Reagentes</u>	37
3.2	Métodos de análise	38
3.2.1	<u>Pesagens</u>	38
3.2.2	<u>Ponto de fusão</u>	38
3.2.3	<u>Análise elementar</u>	38
3.2.4	<u>Condutivimetria</u>	38
3.2.5	<u>Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV)</u>	39
3.2.6	<u>Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)</u>	39
3.2.7	<u>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</u>	39
3.2.8	<u>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do estado sólido</u>	39
3.2.9	<u>Espectrometria de massas</u>	40
3.2.10	<u>Difração de raios X de monocristal</u>	40
3.3	Sínteses	40
3.3.1	<u>Preparo de precursores N4-cicloexil tiossemicarbazida</u>	42
3.3.2	<u>Tiossemicarbazonas</u>	42
3.3.3	<u>Síntese dos complexos de gálio(III)</u>	43
3.3.4	<u>Síntese dos complexos de bismuto (III) e de antimônio (III)</u>	44
3.3.5	<u>Aminas e bases de Schiff derivadas de p-nitrofeniletilenodiamina</u>	45
3.4	Avaliação da atividade biológica	48
3.4.1	<u>Atividade citotóxica</u>	48
3.4.2	<u>Atividade antituberculose</u>	49
4	2-PIRAZINOFORMAMIDA TIOSSEMICARBAZONA E SEUS DERIVADOS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS	

	ATIVIDADES ANTITUBERCULOSE E CONTRA CÉLULAS TUMORAIS.....	51
4.1	Caracterização de 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona e seus derivados.....	52
4.1.1	<u>Espectros no infravermelho.....</u>	53
4.1.2	<u>Espectroscopia eletrônica.....</u>	55
4.1.3	<u>Ressonância magnética nuclear.....</u>	55
4.1.4	<u>Espectrometria de massas.....</u>	59
4.1.5	<u>Estrutura cristalográfica.....</u>	60
4.2	Atividade biológica das tiossemicarbazonas.....	63
4.2.1	<u>Atividade citotóxica.....</u>	63
4.2.2	<u>Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....</u>	63
5	COMPLEXOS DE GÁLIO(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 2-PIRAZINOFORMAMIDA	65
5.1	Caracterização dos complexos de gálio (III).....	65
5.1.1	<u>Características gerais, microanálise e condutividade molar.....</u>	65
5.1.2	<u>Espectroscopia no infravermelho.....</u>	66
5.1.3	<u>Espectroscopia eletrônica.....</u>	68
5.1.4	<u>Espectros de ressonância magnética nuclear.....</u>	70
5.1.5	<u>Espectrometria de massas.....</u>	79
5.2	Atividade biológica.....	80
5.2.1	<u>Atividade citotóxica.....</u>	80
5.2.2	<u>Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....</u>	82
6	COMPLEXOS DE BISMUTO(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 2-PIRAZINOFORMAMIDA.....	85
6.1	Caracterização dos complexos de bismuto(III).....	85
6.1.1	<u>Características gerais, microanálises e condutividade molar.....</u>	85
6.1.2	<u>Espectroscopia no infravermelho.....</u>	86
6.1.3	<u>Espectroscopia eletrônica.....</u>	88
6.1.4	<u>Ressonância magnética nuclear.....</u>	90
6.1.5	<u>Espectrometria de massa.....</u>	93
6.2	Atividade biológica dos complexos de bismuto(III).....	95
6.2.1	<u>Atividade citotóxica.....</u>	95

6.2.2	<u>Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i></u>	96
7	COMPLEXOS DE ANTIMÔNIO (III) COM TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 2-PIRAZINOFORMAMIDA	98
7.1	Caracterização dos complexos de antimônio (III)	98
7.1.1	<u>Características gerais, microanálise e condutividade molar</u>	98
7.1.2	<u>Espectroscopia no Infravermelho</u>	99
7.1.3	<u>Ressonância Magnética Nuclear de Sólido</u>	101
7.1.4	<u>Espectrometria de massas</u>	104
7.2	Atividade biológica	105
7.2.1	<u>Atividade citotóxica</u>	105
7.2.2	<u>Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i></u>	106
8	CARACTERIZAÇÃO DAS AMINAS DE BASES E DE SCHIFF DERIVADAS DE P-NITROFENILETILENODIAMINA	109
8.1	Caracterização das aminas e Bases de Schiff	109
8.1.2	<u>Espectroscopia no Infravermelho</u>	109
8.1.3	<u>Ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C</u>	110
8.1.4	<u>Espectrometria de massas (ESI-MS)</u>	115
8.2	Atividade biológica das bases de Schiff	115
8.2.1	<u>Atividade citotóxica</u>	115
8.2.2	<u>Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i></u>	117
	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	121
	APÊNDICE A - Espectros vibracionais.....	133
	APÊNDICE B - Espectros eletrônicos.....	144
	APÊNDICE C - Espectros de RMN de ¹ H, ¹³ C, APT, COSY e HSQC.....	149
	APÊNDICE D - Espectros de massas (ESI-MS).....	173
	APÊNDICE E -Dados cristalográficos de HPzAm4E.....	184
	APÊNDICE F -Artigos.....	185

INTRODUÇÃO

A Química Orgânica tem feito inúmeras contribuições para a Medicina através da descoberta de princípios ativos, do planejamento e síntese de fármacos. No entanto, a Química Inorgânica tem igualmente um papel importante, nomeadamente na pesquisa e no desenvolvimento de novos medicamentos cujo mecanismo de ação envolve a interação de um composto orgânico com um metal.

Alguns metais têm um papel essencial nos sistemas vivos pois interagem com moléculas biológicas importantes, como proteínas e o DNA e também apresentam afinidade por moléculas como O₂ e o óxido nítrico, NO. Dessa forma, durante o processo de evolução natural, vários metais foram incorporados às funções essenciais da vida (Barnhamabc, Bush, 2014;Singh et al., 2011).

As biomoléculas que contêm íons metálicos em geral participam de processos importantes para o funcionamento do organismo. O ferro, presente na hemoglobina e na mioglobina, é fundamental no transporte e armazenamento de O₂, além disso, participa do processo de transporte de elétrons no citocromo. O cálcio, além de ter um papel estrutural fundamental em vários organismos, serve como mensageiro para a ação de hormônios participando dos processos de contração muscular e de coagulação do sangue (Bertini et al., 2007; Shriver, Atkins, 2003). Da mesma forma, o zinco está presente na insulina, hormônio que regula o metabolismo de açúcar no organismo edesempenha papel estrutural nas proteínas dedos de zinco.

A atividade antitumoral de complexos com metais como paládio, cobre, rutênio e ródio tem sido estudada (Brabec, Novakova, 2006;Kaluderovic et al., 2015). Outras atividades farmacológicas têm sido atribuídas a complexos metálicos tais como antimicrobiana, antiparasitária e antiviral (Rahman et al., 2007;Bertini, 2007; Beraldo, 2005).

O desenvolvimento de fármacos anticancerígenos com capacidade de inibir o crescimento celular é uma área de grande relevância. Pesquisadores estudam a elaboração de novos tratamentos quimioterápicos também para o uso em pacientesque já não respondem aos tratamentos tradicionais (Baguley, 2010).

Outra doença que requer atenção no desenvolvimento de novos fármacos éa tuberculose, consideradauma doença negligenciada. Atualmente a tuberculose é uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo. Em 2015, 10,4 milhões de pessoas ficaram doentes, sendo que 1,8 milhões morreram da doença (WHO, 2015). No Rio de Janeiro, a tuberculose é considerada endêmica, sendo um dos estados com maior índice de

contaminação da doença (Brás, 2014). A pirazinamida, juntamente com isoniazida, etambutol e rifampicina, constituem fármacos mais utilizados no tratamento de tuberculose. Embora o tratamento padrão seja considerado eficiente na maioria dos casos, este apresenta algumas limitações, tais como efeitos indesejados e tratamento prolongado, o que contribui para a desistência do tratamento e conseqüentemente para o surgimento de microorganismos resistentes, como *Mycobacterium tuberculosis*, a principal espécie responsável por causar tuberculose (Dheda, Barry, Maartens, 2016).

Sendo assim, faz-se necessária a busca de novos fármacos capazes de apresentarem menores efeitos indesejados, maior eficácia, menor tempo de tratamento e custo reduzido (Lougheed et al., 2009). O uso de agentes quelantes seria uma estratégia interessante para o tratamento dessas doenças. Devido a versatilidade farmacológica e pela facilidade de coordenação a metais, as tiossemicarbazonas e bases de Schiff em geral são objeto de estudo para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, antimicrobianos, antiparasitários (Jalilian et al., 2006).

No presente trabalho foram sintetizadas tiossemicarbazonas derivadas do fármaco pirazinamida e seus complexos de gálio(III), bismuto(III) e antimônio(III). Será apresentada ainda a síntese e caracterização de bases de Schiff derivadas de *p*-nitrofeniletilediamina. Diversos nitro compostos tem demonstrado atividade antimicrobiana, cuja ação tem sido atribuída à inativação de macromoléculas via mecanismo redox. Todos os compostos foram avaliados quanto à sua capacidade em inibir o crescimento de bactérias *M tuberculosis* e das células tumorais SF-295 (glioblastoma- câncer de cérebro), HCT-116 (adenocarcinoma de colon), OVCAR-8 (cancer de ovário) e/ou PC3 (câncer de prostata).

1– OBJETIVOS

1.1– Objetivo Geral

Desenvolver compostos da classe das tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos, na busca por novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais e antituberculose e identificar propriedades químicas para sua atividade biológica.

1.2– Objetivos Específicos

- Sintetizar tiossemicarbazonas derivadas de pirazinamida e seus complexos metálicos de gálio(III), bismuto(III) e antimônio(III).
- Sintetizar bases de Schiff derivadas de *p*-nitro-feniletilenodiamina;
- Investigar a ação dos compostos contra células tumorais das linhagens humanas: OVCAR–8 (câncer de ovário), HCT–116 (adenocarcinoma de cólon), SF–295 (câncer de cérebro) e PC3 (câncer de próstata);
- Investigar a ação dos compostos contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*;
- Avaliar o efeito da coordenação a metais sobre a atividade farmacológica das moléculas orgânicas;
- Correlacionar a atividade farmacológica com a estrutura e propriedades dos compostos.

2–REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástases (Nussbaum, McInees, Willard, 2008). Essa doença é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS, sendo a sigla WHO em inglês, 2014), a cada ano surgem dez milhões de casos novos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em decorrência dessa doença. E de acordo com dados do INCA (INCA, 2016), o câncer é a segunda maior causa de morte no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. A estimativa para o biênio 2016-2017 aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer.

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Existem três principais tipos de tratamento: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Scott, Wolchok, Old, 2012). A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo o corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte (Vardanyan, Hruby, 2016). Na Tabela 1 são mostradas as principais classes de fármacos citotóxicos usados na prática clínica e seus mecanismos de ação (Almeida et al., 2005).

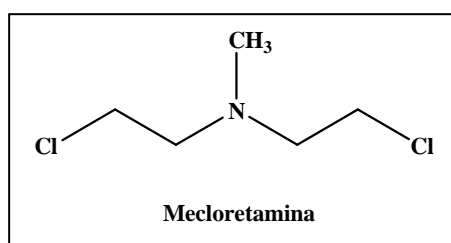
Tabela 1– Algumas classes de quimioterápicos antineoplásicos usados na prática clínica e seus mecanismos de ação

Quimioterápicos	Mecanismo	Exemplos
Agentes alquilantes	ligam-se ao DNA	mostardas nitrogenadas, cisplatina, carboplatina
Antimetabólitos	inibem a biossíntese de componentes essenciais do DNA e RNA	inibidores da síntese de purinas (6-mercaptopurina e 6-tioguanina), inibidores da síntese de ácido tiimidílico (5-fluoracil e metotrexato)
Antibióticos	interagem com DNA ou inibem a síntese de DNA	antraciclina
Inibidores mitóticos	podem impedir a mitose	alcaloides vincristina, vimblastina, vindesina

Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2005.

A primeira droga usada para a quimioterapia do câncer foi o mecloretamina, da classe das mostardas nitrogenadas (Figura 1), útil no combate ao linfoma de Hodgkin (David,Zimmerman, 2010). Este agente foi aprovado para uso clínico, e serviu de composto modelo para o planejamento racional de análogos com potencial atividade antineoplásica (Rider, 2007).

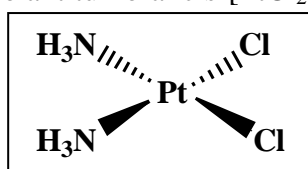
Figura 1– Composto antineoplásico da classe das mostardas nitrogenadas



Fonte: O autor, 2015.

O desenvolvimento de compostos inorgânicos antitumorais, principalmente aqueles contendo metais, foi muito limitado até a demonstração da atividade anticancerígena da *cis*-diaminodichloroplatina(II), conhecida como cisplatina (Figura 2), por Barnett e Rosenberg em 1964 (Jones, Thornback, 2007).

Figura 2–Estrutura do fármaco antitumoral cis -[PtCl₂(NH₃)₂], cisplatina

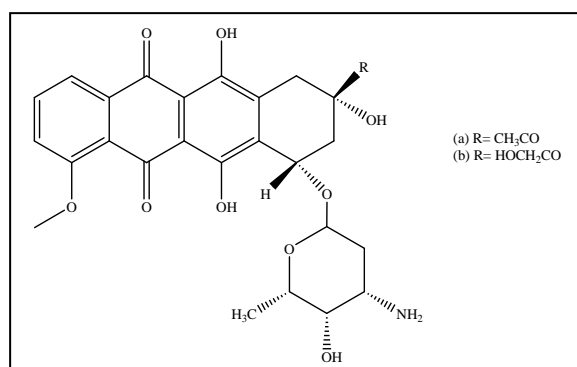


Fonte: O autor, 2015.

A cisplatina entrou em testes clínicos de fase I em 1971 e foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1978 sob o nome comercial de Platinol[®]. Apesar da alta eficácia, a resistência celular, além dos efeitos colaterais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, representam limitação ao seu uso (Gentile, Lohman, Ferguson, 2001). A principal característica dos complexos de platina(II) é ligar-se ao DNA de maneira covalente, interferindo no processo de divisão celular, levando à apoptose e necrose (Neves, Vargas, 2011). A descoberta das propriedades citotóxicas da cisplatina contribuiu para o estudo e desenvolvimento de outros compostos metálicos na terapia do câncer (Arnesano et al., 2011).

No caso das antraciclinas, representam uma importante classe de antibióticos antitumorais (Zhang et al., 2015). São classificados como agentes intercalantes do DNA, mas estudos evidenciam que além da intercalação, há a formação de adutos de estrutura complexa por ligações covalentes com o DNA (Olano, Mendez, Salas, 2009). Como exemplo, são mostrados na Figura 3 os fármacos doxorubicina e daunorrubicina que foram provados pelo FDA para tratamento de câncer de mama e linfomas (Zucker et al., 2012).

Figura 3– Estruturas de daunorrubicina (a) e doxorubicina(b)



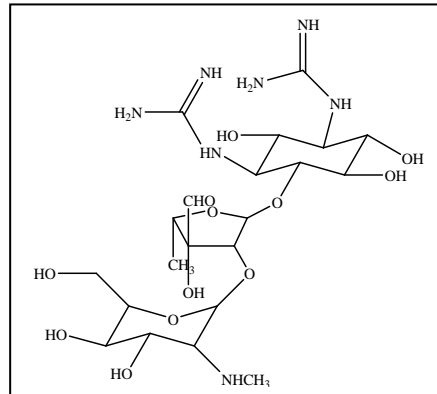
Fonte: O autor, 2015.

A maioria dos agentes utilizados na quimioterapia atua inibindo a síntese de DNA ou mecanismos de replicação celular, mas acabam por apresentar melhor atividade antiproliferativa *in vitro* do que anticâncer. A maior falha da quimioterapia antineoplásica é devida à resistência celular às drogas. Além disso, os fármacos exibem de um modo geral, estreitas janelas terapêuticas, ou seja, as diferenças entre as doses que produzem o efeito antitumoral e as que causam toxicidade são bastante pequenas (Reis, 2006). Apesar do grande investimento na pesquisa do câncer, outras doenças como tuberculose (doença negligenciada), também requer atenção.

A tuberculose (TB) é uma doença antiga que continua a ter um enorme impacto sobre a saúde humana global, sendo uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (Cobo, 2014). A OMS aponta que havia uma estimativa de 10,4 milhões de novos casos de tuberculose no mundo. O Brasil faz parte desse grupo, que em conjunto com outros países (Federação Russa, Índia, China e África do Sul), representam cerca de 50% dos casos mundiais de tuberculose (OMS, 2016). O estado do Rio de Janeiro apresenta a maior incidência de tuberculose no país. No ano de 2014, o coeficiente de incidência no estado do Rio de Janeiro foi 60,9/100.000 habitantes, correspondendo a quase duas vezes a média nacional (Prado Jr, Virgilio, Medronho, 2016).

A tuberculose é uma doença infecciosa cujo principal agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*. As vias aéreas são a principal forma de entrada da micobactéria no organismo humano (Dheda, Barry, Maartens, 2016). O primeiro fármaco antituberculose, desenvolvido por Selman Waksman em 1944, foi a estreptomicina (Figura 4), capaz de atuar de maneira eficaz no combate à doença (Grosset, Singer, 2013).

Figura 4– Primeiro fármaco eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*



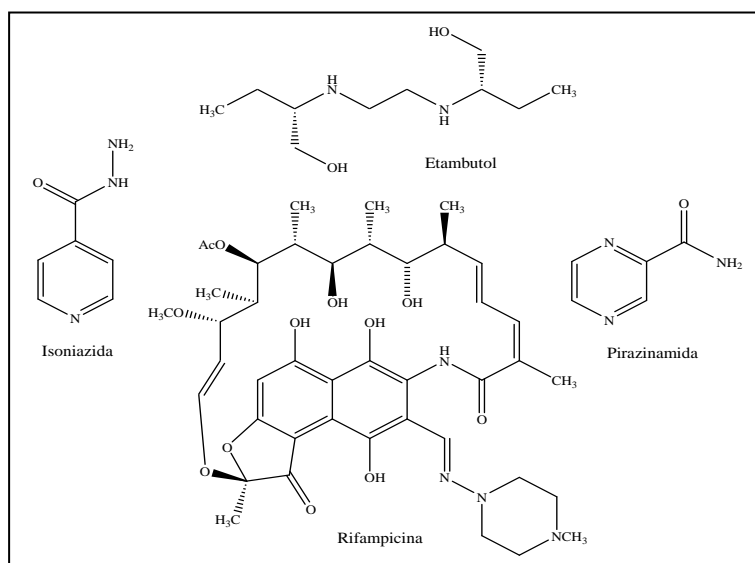
Fonte: O autor, 2015.

Após a descoberta da estreptomicina, novos fármacos foram utilizados no combate à tuberculose. O tratamento de primeira escolha preconizado pela OMS compreende uma terapia combinatória na qual utilizam-se os fármacos isoniazida, pirazinamida, rifampicina e etambutol por um período mínimo de 6 meses (Figura 5) (Cruz-Knight, Blake-Gumbs, 2013; Lima, Bispo, Souza, 2011). A administração destas drogas é feita por via oral e está associada a efeitos colaterais indesejáveis, como náuseas, diarreia e toxicidade a tecidos normais (Duarte et al., 2010).

Compostos como fluorquinolonas também têm sido objeto de intenso estudo no combate à tuberculose devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (Nimmo et al., 2015; Amar et al., 2015).

Um grave problema para o controle da tuberculose é o surgimento da multirresistência às drogas, frequentemente incurável (Lynch, 2013). Possivelmente a multirresistência às drogas é o resultado da acumulação de diferentes mutações independentes e não é fruto de um único evento (Rossetti, 2002).

Figura 5– Estruturas dos principais fármacos utilizados atualmente contra tuberculose



Fonte: O autor, 2015.

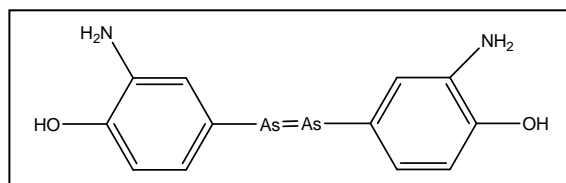
A indústria pouco tem contribuído no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose, que é considerada pela OMS (2009) doença negligenciada. Portanto, pesquisas e desenvolvimento nesta área são necessários para se intensificar a busca por novos fármacos mais eficientes e menos tóxicos.

Uma contribuição que merece especial destaque nas pesquisas de novos fármacos é a da área de Química Medicinal Inorgânica. Há grande interesse pelas potenciais atividades terapêuticas de compostos inorgânicos. Isso é um fenômeno bastante recente, pois compostos cont metais, como os de transição, sempre estiveram associados justamente a intoxicações severas, como pelo chumbo, mercúrio (Zhang et al., 2013; Gerhardsson, Kazantzis, 2015).

É nos últimos 100 anos que compostos inorgânicos com potencial atividade farmacológica tem sido desenvolvidos de forma racional, começando no início de 1900 com $K[Au(CN)_2]$ (Shaw,1999). Robert Kock demonstrou, claramente, os efeitos citotóxicos *in vitro* deste sal de ouro contra o bacilo da tuberculose (Gray, 2003). Eventualmente, a terapia com sais de ouro foi estendida para o tratamento da artrite reumatoide e do lúpus, por conta da crença de que estas doenças eram formas atípicas de tuberculose (Benite, Machado, Barreiro, 2007; Ribeiro et al., 2011).

Em 1910, Paul Erlich desenvolveu o primeiro fármaco antimicrobiano, completamente sintético, o salvarsan (Figura 6), usado no tratamento da sífilis (Lippert, 2014).

Figura 6– Fármaco antimicrobiano Salvarsan

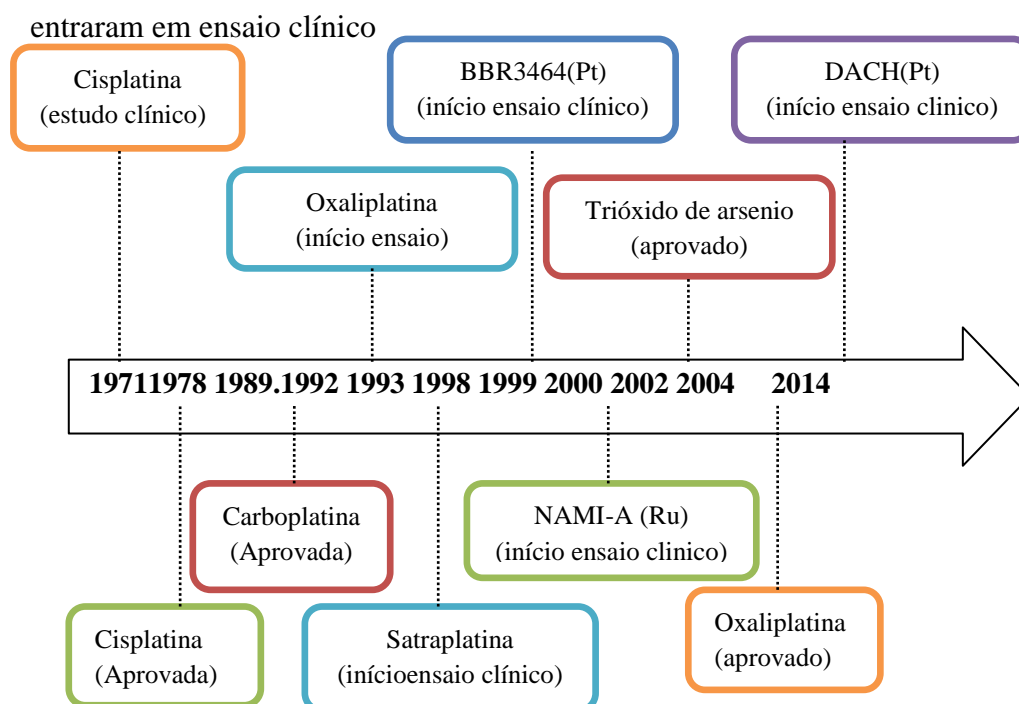


Fonte: O autor, 2015.

Um marco na química inorgânica medicinal foi a descoberta das propriedades antitumorais da *cis*-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina) em 1970 (Kelland, 2007), que constituiu um grande avanço no tratamento de diversos tipos de tumores, como de testículos, bexiga, pulmão, mama (Dasari, Tchounwou, 2014).

Depois dessa descoberta, uma enorme busca foi desencadeada mundialmente, investigando-se complexos de outros metais (principalmente do grupo da platina) que também pudessem ter atividade antitumoral, e de preferência ser menos tóxicos e mais solúveis do que a própria cisplatina (Figura 7) (Frezza et al., 2010). Já foram testados complexos de rutênio, titânio, irídio e ródio, e alguns já estão em fases avançadas de testes clínicos (Bacher, Arion, 2014; Melendez, 2002; Rahman et al., 2007; Muhammad, Guo, 2013).

Figura 7– Histórico de alguns complexos metálicos citotóxicos que foram aprovados ou



Fonte: Adaptado de TRUDU et al., 2015.

Dessa forma, a Química Medicinal Inorgânica tem se tornado objeto de pesquisa ampla, sendo encontrados inúmeros artigos de revisão relevantes sobre essa área (Guo, Sadler, 1999; Orvig, Abrams, 1999; Sessler, 2005; Alberto, 2007; Romero-Canelón, Sadler, 2013; Lippert, 2014).

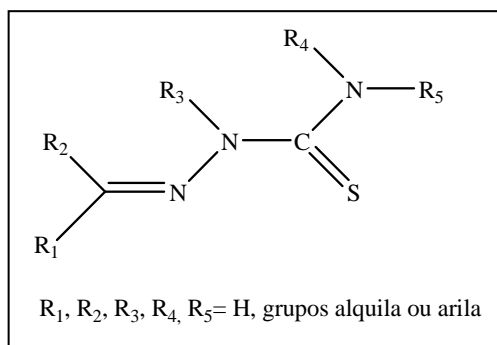
O planejamento de metalofármacos para aplicações não somente como agentes anticâncer mas também como agentes antimicrobianos, antiparasitários e no tratamento de outras doenças, como diabetes, tem sido objeto de ampla investigação. Complexos de rutênio $[\text{RuCl}_2\text{ATZCOD}]$ (ATZ = hidrazonas, COD = 1,5-ciclooctadieno) (Donnici, 2009) e cobre $[\text{CuCl}_2(\text{phen})(\text{LEV})]$ (phen = fenantrolina, LEV = levofloxacino) (Martins, 2012) contendo os ligantes bioativos hidrazonas e quinolonas, respectivamente, têm sido investigados para o tratamento da doença de Chagas e complexos de ouro com ligantes antimaláricos fluorquinolonas (Gouveia, 2013) também se revelam promissores.

O campo da Química Medicinal Inorgânica continua fazendo contribuições importantes no diagnóstico da doença e terapia, e beneficiou substancialmente os avanços no desenvolvimento de ligantes. Tais moléculas, quando associadas a metais ou íons metálicos de interesse, podem aumentar a eficácia no tratamento de uma dada doença, minimizar a toxicidade e permitir a interação com novos alvos da doença (Rocha et al., 2011).

Nesse contexto, tiossemicarbazonas constituem exemplos de importantes classes de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal Inorgânica, em razão de seu amplo perfil farmacológico, sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo bioquímico de ação (Lobana et al., 2009; Rezaeivala, Keypour, 2014)

As tiossemicarbazonas são bases de Schiff que possuem o esqueleto representado na Figura 8, e do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, com rendimentos satisfatórios e sua vasta aplicação como intermediários na síntese orgânica de importantes heterociclos, como os tiazóis (Tenório et al., 2005; Cunha, Silva, 2009; Muthu et al., 2015).

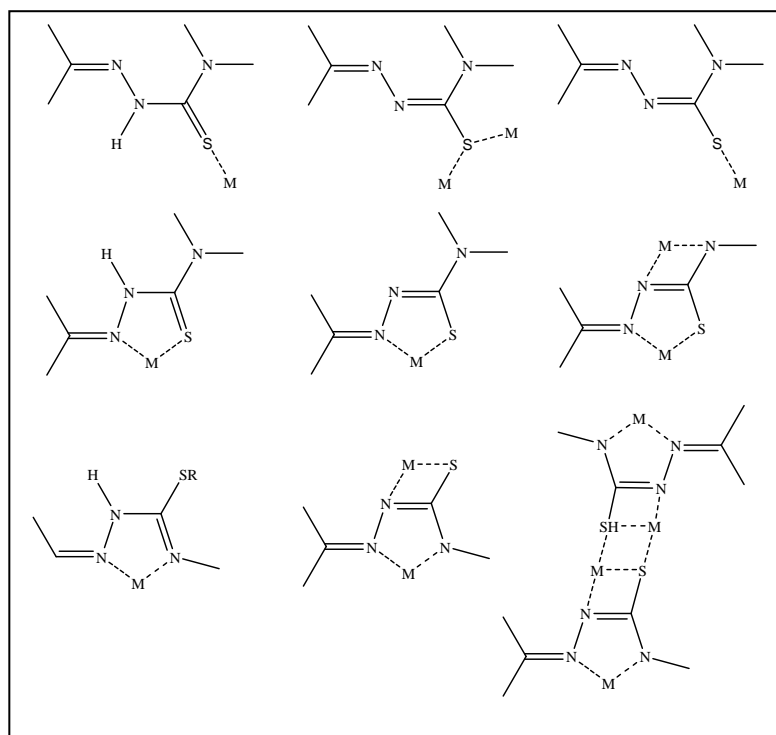
Figura 8– Estrutura genérica das tiossemicarbazonas.



Fonte: O autor, 2015.

As tiossemicarbazonas apresentam vários átomos doadores de elétrons e diferentes modos de coordenação, dependendo dos reagentes de partida e das condições de reação para sua obtenção (Fonseca et al., 2010; Lobana et al., 2009). Os principais modos de coordenação estão representados na Figura 9 (Riobó, 2007).

Figura 9– Alguns modos de coordenação das tiossemicarbazonas



Fonte: Adaptado de RIOBÓ, 2007

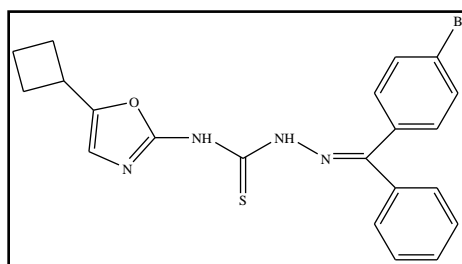
Do ponto de vista biológico, muitos exemplos desta classe de moléculas foram avaliados ao longo dos últimos 50 anos (Batista et al., 2010), e foram relatadas atividades como antitumoral (Silva et al., 2010; Dilovic et al., 2008), antibacteriana (Joseph et al., 2006;

Pavan et al., 2010), antifúngica (Qin et al., 2012), antiviral (Genova et al., 2004; Kesel, 2011) e antiparasitária (Moreno-Rodriguez, 2014).

Uma das áreas mais promissoras em que as tiossemicarbazonas estão sendo desenvolvidas está relacionada ao tratamento contra o câncer. A atividade antineoplásica das tiossemicarbazonas é atribuída aos mecanismos de inibição da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR) (Yu et al., 2009; Zhu et al., 2009), enzima responsável pela manutenção da síntese e reparo do DNA. Atualmente, a triapina, da classe das tiossemicarbazonas está sendo avaliada em testes clínicos de fase IV como possível fármaco antitumoral (ClinicalTrials, 2015).

Atualmente, o único composto da classe das tiossemicarbazonas empregado clinicamente é a tiocetazona (4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona), a qual vem sendo utilizada em associação com a isoniazida desde 1960 no tratamento da tuberculose, com o intuito de prevenir o desenvolvimento de resistência a isoniazida. Entretanto, sua ação predominantemente bacteriostática *in vivo*, além dos efeitos colaterais como a indução de diabetes mellitus e reações cutâneas limitam sua utilização (Echevarria et al., 2010). Devido a este fato, a síntese de novas tiossemicarbazonas com atividade antituberculose (Pavan et al., 2010) é importante. O composto representado na Figura 10, por exemplo, obteve excelentes resultados contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MTB) e cepas de *M. tuberculosis* resistentes a multidrogas (MDR-TB). O composto mostrou concentração mínima inibitória de 0,05 µg/mL contra MTB e MDR-TB *in vitro*. *In vivo*, diminuiu a carga bacteriana nos tecidos do pulmão e baço a uma dose de 50 mg/kg de peso corporal (Sriram et al., 2006).

Figura 10– Composto (4-bromofenil)(fenil)metanonaN-(5-ciclobutil-1,3-oxazol-2-il) tiossemicarbazona



Fonte: O autor, 2015.

A capacidade das tiossemicarbazonas em formar complexos estáveis com uma variedade de metais é de grande importância para sua atividade biológica. A natureza lipofílica do complexo pode ser melhorada em comparação com o ligante livre, e certos efeitos secundários podem ser diminuídos ou ser evitados, além disso, o ligante coordenado ao metal pode funcionar como um carreador e dessa forma, ao se dissociar no organismo o íon metálico pode interagir com um alvo biológico (Farrel, 2002; Bahl et al., 2010). Complexos metálicos também podem exibir bioatividade não mostrada pelo ligante tiossemicarbazona livre e a coordenação pode proporcionar uma redução significativa na resistência a este ligante (Bastos et al., 2010). Estas características levam ao desenvolvimento promissor de novos fármacos.

A coordenação de ligantes a metais, como dito anteriormente, representa um considerável potencial para aumentar o número de drogas disponíveis para tratamento de diversas doenças. A seguir será feita breve descrição dos metais utilizados no desenvolvimento desse trabalho para a produção de moléculas com potencial ação farmacológica.

- Gálio

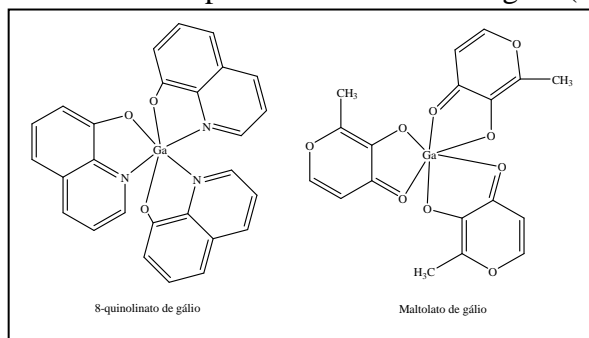
O gálio é um elemento do grupo 13 da tabela periódica de propriedades físicas e químicas diversas, e estas propriedades lhe conferem uma série de aplicações (Fowler, Sexton, 2015). O estado de oxidação mais comum em solução aquosa é 3+. O gálio(III) possui um ambiente octaédrico ou octaédrico distorcido e apresenta uma configuração eletrônica $3d^{10}$ (Bandoli, 2009). A complexação do Ga^{3+} (que é um ácido duro, segundo definição de Pearson) é dominada por ligantes contendo átomos doadores de oxigênio ou nitrogênio (bases duras) (Reichert, Lewis, Anderson, 1999; Miessler, Tarr, 2010).

O metal, na forma de nitrato de gálio, é utilizado para o tratamento da doença óssea de Paget (Verron, Bouler, Scimeca, 2012), enquanto que outras potenciais aplicações médicas do gálio são orientadas principalmente para cancerologia (Chitambar, 2004; 2010; 2016). Resultados mostraram que o nitrato de gálio foi altamente eficaz na redução do crescimento tumoral de linfoma maligno, doença de Hodgkin e outros tumores (Yang, Kroft, Chitambar, 2007).

Apesar do nitrato de gálio ser aprovado para tratamento dos processos malignos, o composto é administrado por via intravenosa e apresenta potencial nefrotoxicidade (Straus, 2003). Assim, novos compostos de gálio(III) estão sendo desenvolvidos, como o 8-

quinolinato de gálio e o maltolato de gálio, que estão em fase de triagem clínica em fase I/II (Figura 11) contra linfomas, câncer de bexiga. A vantagem destes compostos é que são administrados por via oral, além de serem menos tóxicos, permitindo um tratamento crônico e maior biodisponibilidade nos tumores (Enyedy et al., 2015).

Figura 11– Estruturas de complexos antitumorais de gálio(III) em fase clínica

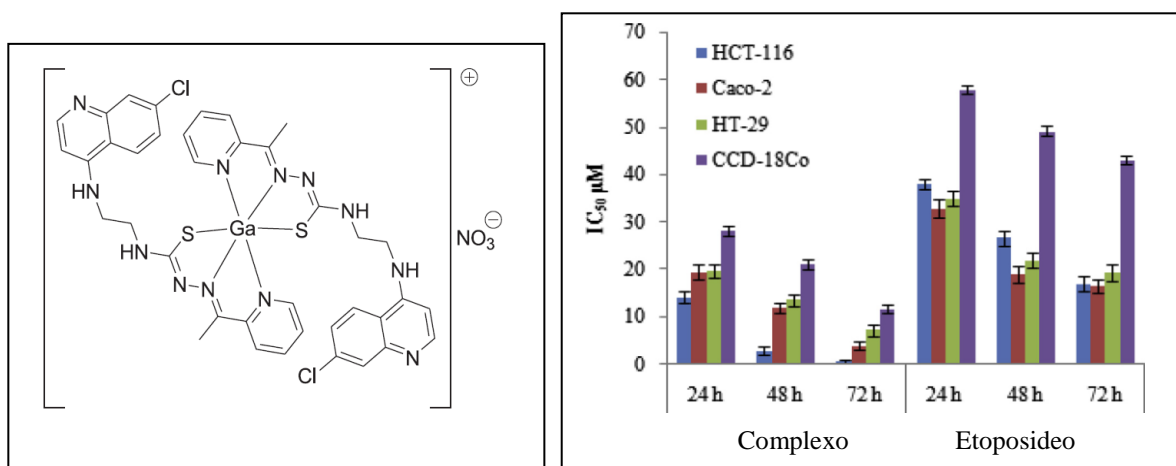


Fonte: O autor, 2015.

O principal interesse clínico deriva da observação que propriedades metabólicas do gálio(III) são similares aquelas do ferro(III). Junto com raios iônicos comparáveis, ambos os elementos mostram quase a mesma capacidade de ligação com ligantes quelatos e proteínas (Melnikov, Malzac, Coelho, 2008). Os mais importantes carreadores do ferro, transferrina e lactoferrina, não distinguem gálio(III) do ferro(III), portanto todo gálio no sangue está presente no plasma na forma de complexos com estas proteínas. Felizmente, como gálio(III) é irreduzível em condições fisiológicas, este íon não poderia competir com ferro(II) em proteínas de ligação, como hemoglobina (Verron, 2012). Gálio acumula em locais de inflamação e infecção e tem exibido atividade anti-inflamatória e imunossupressora em modelos animais de doenças humanas (Yang, Kroft, Chitambar, 2007; Choi et al., 2014).

Pesquisas recentes são promissoras no desenvolvimento de complexos de gálio(III) com as tiossemicarbazonas, como potenciais agentes anticâncer. Complexos de gálio de derivados da 2-acetilpiridina tiossemicarbazona foram relatados previamente (Arion et al., 2002; Moghadam et al., 2007). Kumar e colaboradores (2014) reportaram a síntese de um complexo de gálio(III) com 7-cloroquinolina 2-acetilpiridinatiossemicarbazona e efetuaram testes com células tumorais HCT-116, Caco-2 e HT-29 e em células normais (não-tumorais) CCD-18Co (Figura 12). Os resultados demonstraram uma grande diferença entre as células cancerosas e não cancerosas. A maior atividade antiproliferativa foi observada após 72 h de tratamento para as três linhagens de células, sendo que para HCT-116 foi obtido o melhor índice de seletividade (21,47).

Figura 12– Efeito do complexo de gálio(III) com 7-cloroquinolina 2-acetilpiridinatiossemicarbazona e do fármaco etoposídeo sobre as linhagens de células cancerosas HCT-116, Caco-2, HT-29 e CCD-18Co após 24, 48 e 72 h de tratamento.



Fonte: KUMAR et al., 2004

Legenda: HCT-116 (carcinoma colorretal humano), Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano), HT-29 (adenocarcinoma de colon humano), CCD-18Co (célula não cancerosa de colon humano)

Como sais de gálio são empregados clinicamente em pacientes portadores de alguns tipos de câncer (Straus, 2003), a ideia de aliar as propriedades terapêuticas das tiossemicarbazonas às do metal poderia constituir um caminho para o desenvolvimento de novas drogas e novas aplicações biológicas.

- Bismuto

A química do bismuto pode ser comparada com a do antimônio, ambos pertencentes ao mesmo grupo da tabela periódica. Embora haja muitas similaridades, o bismuto apresenta importantes diferenças na reatividade química, em comparação com o antimônio, muitas dessas diferenças sendo devido ao efeito do par inerte, que aumenta de cima para baixo na tabela periódica. Isto significa que o estado de oxidação 5+ é menos estável para o bismuto do que para o antimônio (Fowler, Sullivan, Sexton, 2015). Assim, poucos complexos de Bi⁵⁺ são conhecidos, contudo os compostos de Bi³⁺ são facilmente encontrados (Yang, Sun, 2007).

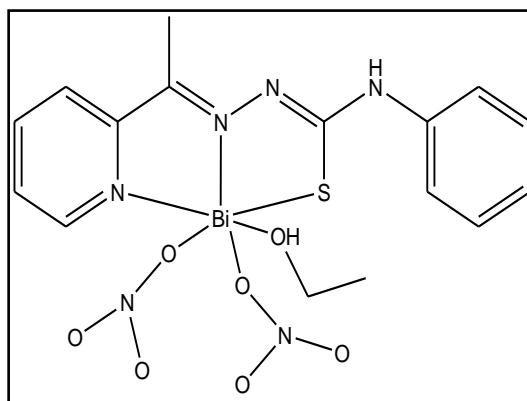
O uso dos compostos de bismuto(III) em medicina foi descrito a partir da idade média. O primeiro uso do bismuto(III) foi relatado em 1786 por Louis Odier para o tratamento de doenças de dispepsia, caracterizado pela desordem da função digestiva (Rieder, 2012).

Atualmente, os compostos de bismuto(III) são usados no tratamento de várias infecções microbianas, assim como: sífilis (tartarato de potássio/sódio, iodobismitol, cloreto de bismuto), infecções em ferimentos (óxido de bismuto), malária (tioglicolato de bismuto e sódio) e diarreia (subsalicilato de bismuto, nitrato de bismuto). Outro uso importante de compostos de bismuto(III) na medicina, na formas das formulações De-nol®, Pepto-Bismol® e Pylorid®, envolve o tratamento de úlcera induzida pela bactéria *gram*-negativa *Helicobacterpylori* (Guerra, Alves, Silva, 2010; Yang, Sun, 2007). A eficácia desses compostos é atribuída à sua ação bactericida contra *H. pylori*. A inibição enzimática tem sido sugerida como um possível mecanismo de ação do bismuto no tratamento de úlceras e infecções provocadas pela bactéria. O bismuto(III) se liga a grupos tióis das enzimas agindo como um inibidor não competitivo, de acordo com estudos cinéticos realizados (Ge, Sun, 2007).

O bismuto apresenta toxicidade aceitável, contrastando com outros metais como, por exemplo, arsênio e chumbo, que são altamente tóxicos. Fármacos à base de bismuto são considerados seguros, tendo como efeitos colaterais mais graves a disfunção neurológica e a nefrotoxicidade em consequência da superdosagem (Rodrigues, Ruggiero, Guerra, 2009). Além disso, o bismuto(III) não apresenta efeito carcinogênico, possibilitando o uso clínico desse metal (Mehring, 2007).

Atualmente, muitos compostos de bismuto(III) vêm sendo sintetizados e apresentam potenciais aplicações clínicas na saúde. Os principais estudos da potencial aplicação medicinal dos compostos de bismuto são centrados em dois campos: antimicrobiano e anticancer (Mahajan, Swami, Singhr, 2009). A atividade antitumoral tem sido demonstrada para complexos de bismuto de uma variedade de ligantes como, por exemplo, ditiocarbamatos (Ozturk et al., 2014) e tiolatos (Bertini et al., 2007). Na literatura há ainda estudos da citotoxicidade de complexos de bismuto(III) com ligantes tiossemicarbazonas (Li et al., 2012; Li et al., 2013). Li e colaboradores (2013) sintetizaram um composto de bismuto(III) com tiossemicarbazona e efetuaram testes com quatro células humanas cancerosas HCT-116 (coloretal), Hela (cervical), HepG2 (hepáticas) e K562 (leucêmicas), utilizando a cisplatina como fármaco de referência. O composto [Bi(2-acetilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazonato)(NO₃)₂(CH₃CH₂OH)] (Figura 13) apresentou menor valor de CI₅₀ (5,22 μM) em células leucêmicas quando comparado ao ligante 2-acetilpiridina *N*(4)-feniltiossemicarbazona (94,7 μM) e ao sal Bi(NO₃)₃·5H₂O (41,2 μM). Importante ressaltar que este complexo de bismuto mostrou excelente atividade, similar à da cisplatina CI₅₀ (1,2 μM).

Figura 13– Estrutura química do complexo de bismuto(III) [Bi(2-acetilpiridina N(4)-feniltiossemicarbazonato)(NO₃)₂(CH₃CH₂OH)]



Fonte: O autor, 2015.

- Antimônio

O antimônio é um ametal, elemento pertencente ao grupo 15 da tabela periódica. Com a configuração $[\text{Kr}]5s^25p^3$ em sua forma neutra, o antimônio apresenta os estados 5+ e 3+ como principais estados de oxidação (De Boeck, Kirsch-Volders, Lison, 2003; Tella, Pokrovski, 2009; Cotton, Wilkinson, 1988). O número de coordenação do antimônio(III) e antimônio(V) é variável, sendo que compostos hexa e pentacoordenados são mais frequentemente encontrados com a hibridização sp^3d^2 e sp^3d , assumindo geometria octaédrica e bipirâmide trigonal, respectivamente (Cotton, Wilkinson, 1988; King, 1994).

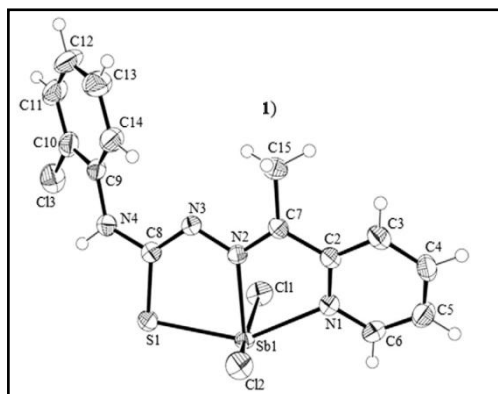
As informações sobre a toxicidade do antimônio são limitadas. O seu comportamento toxicológico e fisiológico depende de seu estado de oxidação, presença de ligantes e solubilidade dos seus compostos (Tylenda, Fowler, 2007). As espécies inorgânicas são mais tóxicas que as orgânicas, devido a forte ligação de Sb^{3+} e, em menos extensão, Sb^{5+} com grupos $-\text{SH}$ presentes em muitas proteínas, resultando, possivelmente, na desativação de sítios funcionais biologicamente relevantes (Moura et al., 2008).

Atualmente os medicamentos antimoniais pentavalentes são empregados essencialmente na terapêutica das doenças parasitárias leishmaniose e esquistossomose, embora apresentem sérios efeitos colaterais (Guha et al., 2014; Katz, Coelho, 2008). Apesar do medicamento antimonial esteja geralmente disponível aos pacientes, o seu potencial hepato, cardio e nefrotóxico, aliado a outros efeitos colaterais, como dores musculares e o seu uso parenteral exclusivo, representa um sério obstáculo ao tratamento adequado dos casos,

levando à redução, interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes do seu término (Mohammdzadeha, Behnaz, Golshan, 2013; Dalimi et al., 2015).

Uma série de complexos de antimônio(III) com ligantes 2-acetilpiridina-tiossemicarbazonas e 2-benzoilpiridina-tiossemicarbazonas substituídas em *N*(4) por fenil, *orto*-bromofenil ou *orto*-nitrofenil) foi avaliada quanto à atividade antiparasitária *in vitro* frente ao *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos por Parrilha e colaboradores (2012) revelaram que os compostos [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂] (Figura 14) e [Sb(2Bz4oClPh)Cl₂] foram os mais ativos com ID₅₀ de 0,14 μmolL⁻¹ e 0,11 μmolL⁻¹ quando comparados ao fármaco de referência nifurtimox (7,7 μmolL⁻¹). A coordenação ao antimônio(III) (ID₅₀= 0,11-0,26 μmolL⁻¹) aumentou a atividade quando comparada ao ligante livre (ID₅₀= 0,12-0,36 μmolL⁻¹).

Figura 14– Estrutura molecular do composto [Sb(2Ac4oClPh)Cl₂]



Fonte: PARRILHA et al., 2012

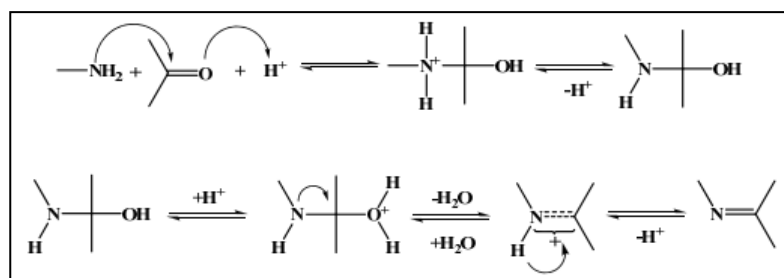
Outros estudos farmacológicos também vêm sendo realizados, como por exemplo, de atividades citotóxicas (Reis et al., 2010) e bacteriana (Kasuga et al., 2006) de complexos de antimônio(III) com tiossemicarbazonas.

- Bases de Schiff

De acordo com a definição da IUPAC, uma base de Schiff é um grupo funcional com um grupo hidrocarbonil que contém uma ligação dupla carbono-nitrogênio com o átomo de nitrogênio conectado a grupo aril ou alquil (não há hidrogênio) (IUPAC, 1995)

A condensação de grupos carbonílicos com aminas primárias foi descoberta em 1864 por Hugo Schiff. A condensação clássica de Schiff utilizando compostos monocarbonílicos e aminas em meio ácido apresenta altos rendimentos. O mecanismo será mostrado na Figura 15:

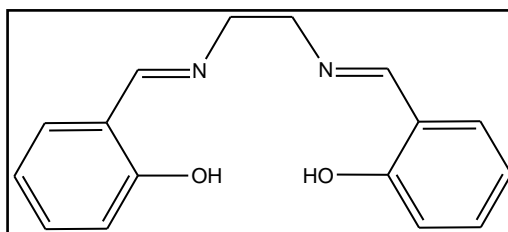
Figura 15– Mecanismo proposto para condensação de compostos carbonílicos e aminas primárias, catalisada por ácido, formando iminas



Fonte: Wilson et al, 1994.

Entre as bases de Schiff já estudadas, uma das mais conhecidas é o *N-N*(bis-salicilideno)etilenodiamina, também conhecida pela abreviação Salen, representada na Figura16, obtida da reação de condensação entre o salicilaldeído e a etilenodiamina, e apresenta propriedade fluorescente (Yu et al., 2016).

Figura 16– Representação da estrutura do Salen



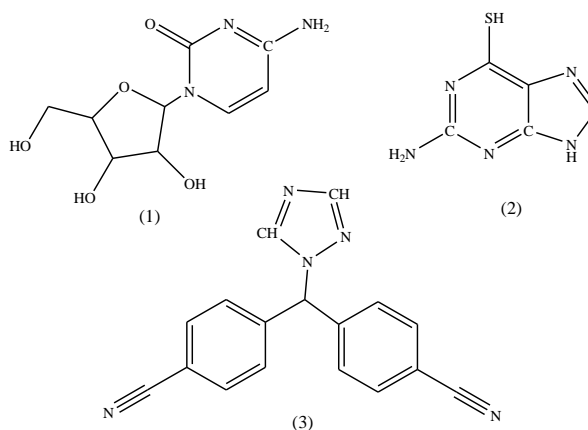
Fonte: O autor, 2015.

As bases de Schiff são bastante utilizadas como reagentes analíticos, uma vez que elas possibilitam preparos não dispendiosos e simples de muitas substâncias, tanto inorgânicas como orgânicas. Por exemplo, na área de bioinorgânica, as bases de Schiff possibilitam a construção de modelos sintéticos de metalo-proteínas e metalo-enzimas (Ueno et al., 2004).

Ligantes bases de Schiff são moléculas importantes capazes de se coordenar a íons metálicos pelo nitrogênio imínico e, caso tenha, por outrabase de Lewis presente no ligante estabilizando metais em vários estados de oxidação (Xiao et al., 2008). As iminas extensivamente são estudadas, sua flexibilidade pode ser facilmente ampliada pela hidrogenação da ligação dupla da imina, podendo, dessa forma, coordenar íons metálicos mais favoravelmente, com seletividade e sensibilidade para com o átomo metálico central. (Shakir et al., 2011; Ispir, Toroglu, Kayraldiz, 2008).

As bases de Schiff têm se mostrado como importantes candidatas a fármacos, por apresentarem importantes propriedades químicas e biológicas tais como, a habilidade de se ligar reversivelmente ao oxigênio, promover reações redox em sistemas biológicos, clivar e oxidar o DNA, plasmídeos e proteínas e promover a apoptose. Com isso, esses compostos têm mostrado atividades farmacológicas do tipo: antibacteriana, antifúngica e, particularmente, antitumoral. As bases de Schiff também têm sido utilizadas como compostos modelo no desenvolvimento de radiofármacos- ^{99m}Tc (Zaheer et al., 2011). Vale ressaltar que muitos fármacos utilizados na clínica médica atual apresentam em sua estrutura química grupamentos imínicos. A Figura 17 apresenta como exemplo, estruturas moleculares de fármacos comerciais antineoplásicos contendo base Schiff (Cruz, 2012).

Figura 17– Estruturas moleculares de alguns fármacos antineoplásicos contendo grupamentos C=N (1) citarabina; (2) 6-tioguanina; (3) letrozol



Fonte: CRUZ, 2012

3–PARTE EXPERIMENTAL

3.1–Materiais

3.1.1–Solventes

Acetonitrila 99,9% (Tedia)

Dimetilformamida 99,8% (Tedia)

Dimetilsulfóxido 99,8% (Tedia)

Etanol 92,6% (Tedia)

Éter etílico (Tedia)

Metanol 99,9% (Tedia)

Água destilada

3.1.2–Reagentes

Cloreto de antimônio(III) (Sigma-aldrich)

Cloreto de bismuto(III) (Aldrich)

Nitrato de gálio(III) hidratado (Sigma-aldrich)

Tiossemicarbazida (Sigma-aldrich)

4-Metil-3-tiossemicarbazida (Aldrich)

4-Etil-3-tiossemicarbazida (Aldrich)

4-Fenil-3-tiossemicarbazida (Sigma-aldrich)

Hidrato de hidrazina (Reagen)

Isotiocianato de cicloexila (Aldrich)

Pirazinacarbonitrila (Aldrich)

Sódio metálico (Tedia)

1-fluoro-4-nitrobenzeno (Sigma-aldrich)

2-hidroxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

2,3-hidroxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

2,4-hidroxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

2,5-hidroxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

3,4-hidroxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (Sigma-aldrich)

2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído (Sigma-aldrich)

5-nitrotiofeno-2-carbaldeído (Sigma-aldrich)

5-nitrofurano-2-carbaldeído (Sigma-aldrich)

3.2– Métodos de análise:

3.2.1–Pesagens

As pesagens foram feitas em uma balança analítica Shimadzu AY 220, precisão 0,0001g.

3.2.2–Ponto de Fusão

O ponto de fusão dos compostos foi obtido em um aparelho Gehaka PF 1500 Farma, detemperatura máxima de manipulação de 350°C, localizado no Departamento de Química Geral e Inorgânica (DQGI) da UERJ.

3.2.3–Análise Elementar

Percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram quantificados utilizando-se um analisador CHN Perkin-Elmer 2400 do Instituto de Química da USP (Central Analítica).

3.2.4–Condutivimetria

As medidas de condutividade elétrica molar dos complexos foram feitas em soluções de dimetilformamida (Concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e metanol (Concentração $6 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Para tal foi utilizado um condutivímetro digital CG 1800 Gehaka localizado no DQGI/UERJ. A classificação do tipo de eletrólito foi feita com base na tabela abaixo (Geary, 1971).

Tabela 2– Tipo de eletrólito para soluções $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em dimetilformamida e metanol

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

Fonte: GEARY, 1971

3.2.5–Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV)

Os espectros foram registrados na região de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se um espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu IR Tracer-100 do Departamento de Química da UFRJ-Macaé em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. Jorge Amim Júnior (UFRJ-Macaé) e um espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-R em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. Marcus Vinicius (Fiocruz). Os experimentos foram feitos em pastilhas de KBr.

3.2.6–Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro Agilent Technologies 8453 do DQGI/UERJ. Os experimentos foram feitos em dimetilformamida (Concentração $\sim 10^{-3}$ a 10^{-5} molL^{-1}) e metanol (Concentração $\sim 10^{-3}$ a 10^{-5} molL^{-1}) grau espectroscópico, utilizando-se células de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

3.2.7–Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC foram obtidos no espectrofotômetro Varian 600 MHz do IME em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. Figueroa (IME) e em um espectrofotômetro Bruker 400 MHz da Fiocruz em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. Marcus Vinicius N. de Souza (Fiocruz) usando-se $\text{DMSO-}d_6$ (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.2.8–Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos no espectrômetro Agilent VNMRS 500, 11,74 T em colaboração com a pesquisadora Prof. Dr. Mônica Marques (UERJ). Os parâmetros de aquisição para os espectros qualitativos de carbono-13 no estado sólido foram: os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), tendo como referência interna o hexametilbenzeno (17,3 ppm para o RMN ^{13}C). Frequência do ^{13}C = 125 MHz. RMN CP-MASSW = 62500; AT = 0,016 s.; Delay = 5 s; pulso de 90° , número de acumulação = 10.000 e tempo de contato = 1000ms e temperatura 25°C .

3.2.9–Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro MicroMass ZQ 4000 waters electrospray (ESI-MS), detector triplo-quadrupolo da Fiocruz em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. Marcus Vinicius N. de Souza (Fiocruz), utilizando-se metanol grau espectroscópico como solvente. Esses espectros foram obtidos nos modos positivo ou negativo, dependendo da amostra.

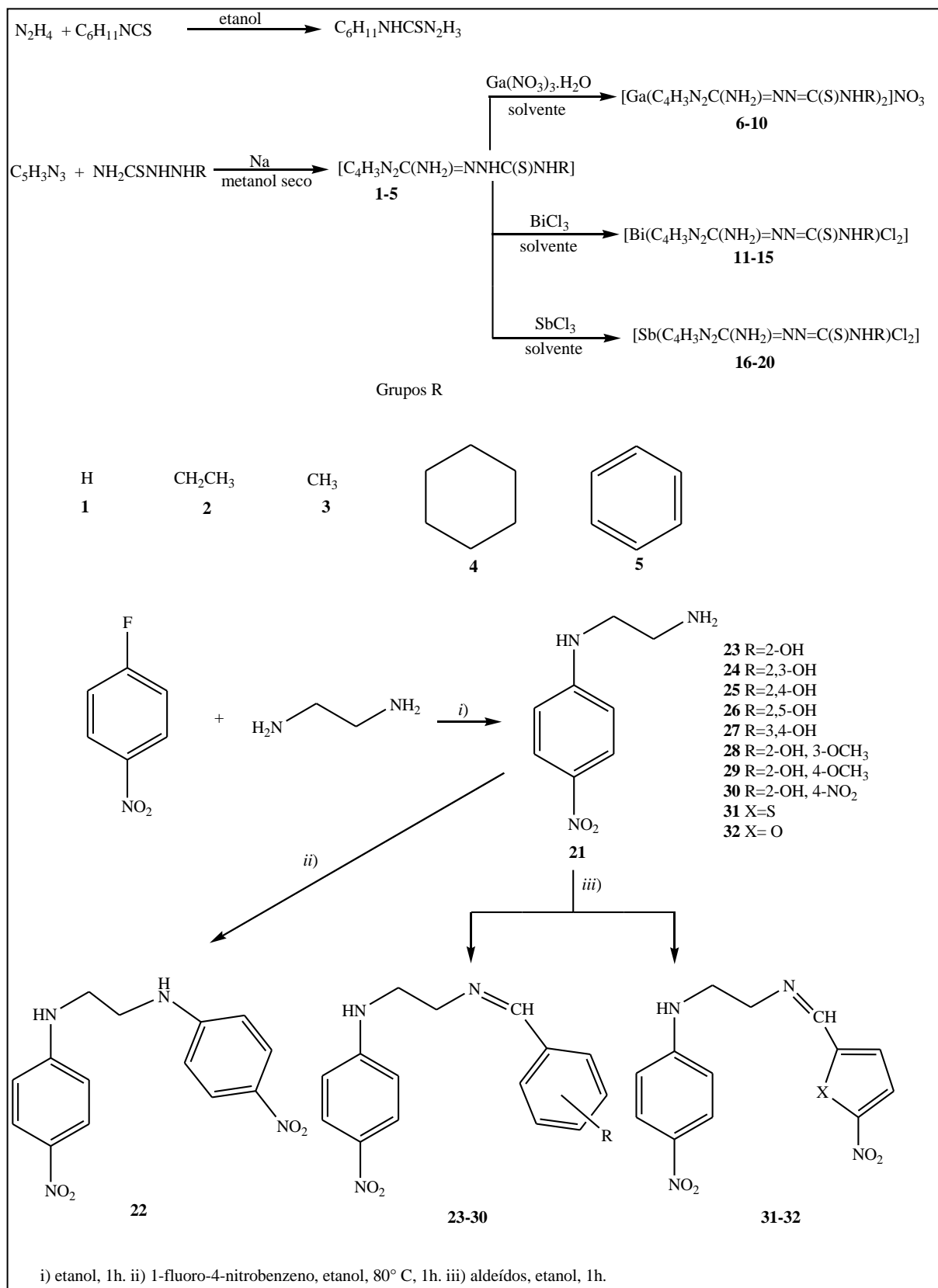
3.2.10–Difração de raios X por monocristal

A estrutura foi determinada em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. Jackson Resende (Instituto de Química, UFF). Monocristais de HPzAm4E foram obtidos em solução de etanol e submetidos a análise por difração de raios X de monocristal. Os dados do composto foram obtidos à temperatura ambiente com radiação Mo-K α , utilizando-se um difratômetro Bruker D8 VENTURE com detector PHOTON 100 CMOS. O equipamento foi controlado com o pacote de software APEX2 (Bruker, 2014). Os dados foram processados com o programa SAINT (Bruker, 2014) e refinados com os programas SADABS (Bruker, 2014) e OLEX 2 (Dolomanov et al., 2009). Utilizando Olex (Dolomanov et al., 2009), a estrutura foi resolvida com o programa SHELXS-97 (Sheldrich, 2008) e dados foram refinados com SHELXL-2013 (Sheldrich, 2008).

3.3–**Sínteses**

A Figura 18 mostra um esquema das sínteses dos compostos estudados nesse trabalho.

Figura 18–Esquema das sínteses dos compostos sintetizados neste trabalho

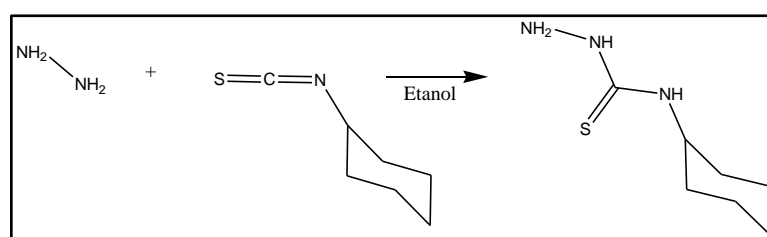


3.3.1–Preparo do precursor N^4 -cicloexil tiossemicarbazida

Para as sínteses das tiossemicarbazonas foram empregadas tiossemicarbazidas (Figura 19) de interesse, as quais foram obtidas comercialmente, com exceção de N^4 -ciclohexil tiossemicarbazida, a qual foi preparada conforme a metodologia descrita a seguir.

A um balão de fundo redondo contendo 40 mL de etanol foram adicionados 20 mmol de hidrazina hidratada. Quantidade equimolar de isotiocianato de cicloexila (2,9 mL) foi adicionada lentamente à solução. A mistura foi mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. O sólido formado foi lavado com etanol e éter etílico. A tiossemicarbazida foi caracterizada por ponto de fusão e espectroscopia no infravermelho.

Figura 19– Esquema de preparo da tiossemicarbazida



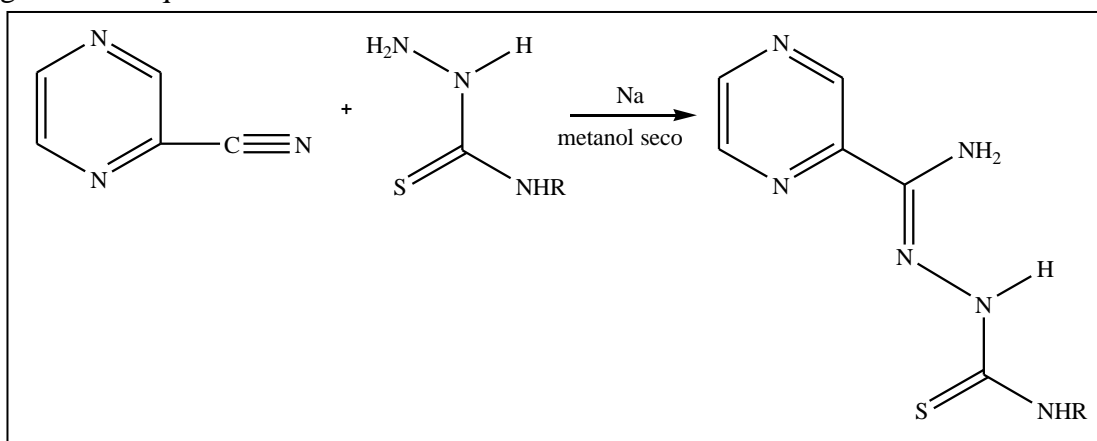
Fonte: O autor, 2015.

3.3.2–Tiossemicarbazonas

A síntese desses compostos (Figura 20) foi feita segundo procedimentos descritos na literatura (Castiñeiras et al., 2014). Os compostos 2-pirazinoformamida-tiossemicarbazona (HPzAm4DH), $N(4)$ -metil-2-pirazinoformamida-tiossemicarbazona (HPzAm4M) e $N(4)$ -etil-2-pirazinoformamida-tiossemicarbazona (HPzAm4E) já foram publicados na literatura (Castiñeiras et al., 2014) enquanto que $N(4)$ -cicloexil-2-pirazinoformamida (HPzAm4Cex) e $N(4)$ -fenil-2-pirazinoformamida (HPzAm4Ph) são inéditos, sendo a síntese e caracterização recentemente publicados por nosso grupo (Amim et al., 2015).

A um balão contendo 15 mL de metanol seco adicionaram-se 2 mmol de sódio metálico sob agitação. Após a dissolução, acrescentaram-se 12 mmol de pirazina-2-carbonitrila (1,08 mL). Após a redução da pirazina-2-carbonitrila, adicionaram-se em pequenas quantidades 12 mmol da tiossemicarbazida desejada. A solução foi deixada em refluxo por 4 h e em agitação por 24 h. Os sólidos amarelos formados foram lavados com metanol e éter etílico. Os produtos foram seco em estufa.

Figura 20– Esquema de síntese das tiossemicarbazonas



R=H(HPzAm4DH), CH₃(HPzAm4M), CH₂CH₃(HPzAm4E), C₆H₁₁(HPzAm4Cex), C₆H₅(HPzAm4Ph)

Fonte: O autor, 2015

As tiossemicarbazonas foram caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia vibracional no infravermelho, espectroscopia eletrônica, RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, APT e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

3.3.3–Síntese dos complexos de gálio(III)

Foram sintetizados quatro novos complexos de gálio(III) com os ligantes tiossemicarbazonas (Figura 21) conforme procedimento descrito a seguir:

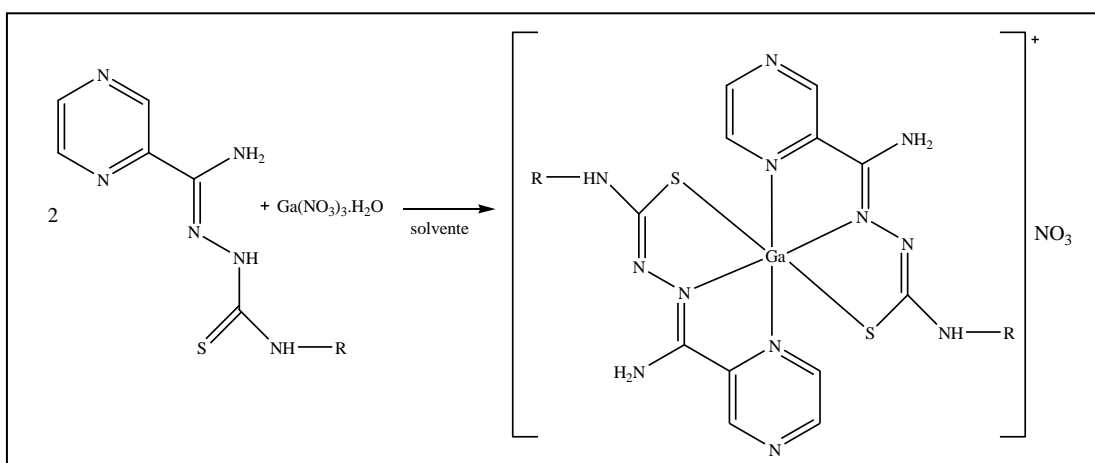
A um balão de fundo redondo contendo 3,0 mmol da tiossemicarbazona desejada em 15 mL de metanol seco, sob agitação, foi adicionado 1,5 mmol de Ga(NO₃)₃·H₂O. A mistura foi submetida a refluxo por 6 h e permaneceu sob agitação por 24 h. Ao final desse tempo, a mistura foi filtrada em papel de filtro sob vácuo, lavada em metanol e em seguida com éter etílico. O sólido alaranjado obtido foi seco em estufa. A reação de formação do complexo de gálio(III) com HPzAm4Cex foi realizada em acetona e com HPzAm4Ph em etanol.

Os complexos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, condutivimetria, espectroscopia vibracional no infravermelho, espectroscopia eletrônica, RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, APT e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

A reação de obtenção de um complexo de gálio(III) com a tiossemicarbazona HPzAm4DH não foi bem sucedida utilizando-se a metodologia descrita acima. Além do complexo de interesse, era obtido como subproduto o ligante ciclizado. Após tentativas de

obtenção, que passaram por mudança de solvente, tempo de agitação e condições com e sem aquecimento, o subproduto sempre era obtido. Dados de RMN que comprovam a formação dos produtos nessa síntese serão mostrados no capítulo 6, juntamente com os dados de caracterização completa dos demais complexos de gálio(III).

Figura 21–Esquema de síntese dos complexos de gálio(III) com tiossemicarbazonas de interesse



R= H (HPzAm4DH)(6), CH_3 (HPzAm4M)(7), CH_2CH_3 (HPzAm4E)(8), C_6H_{11} (HPzAm4Cex)(9), C_6H_5 (HPzAm4Ph)(10)

Fonte: O autor, 2015.

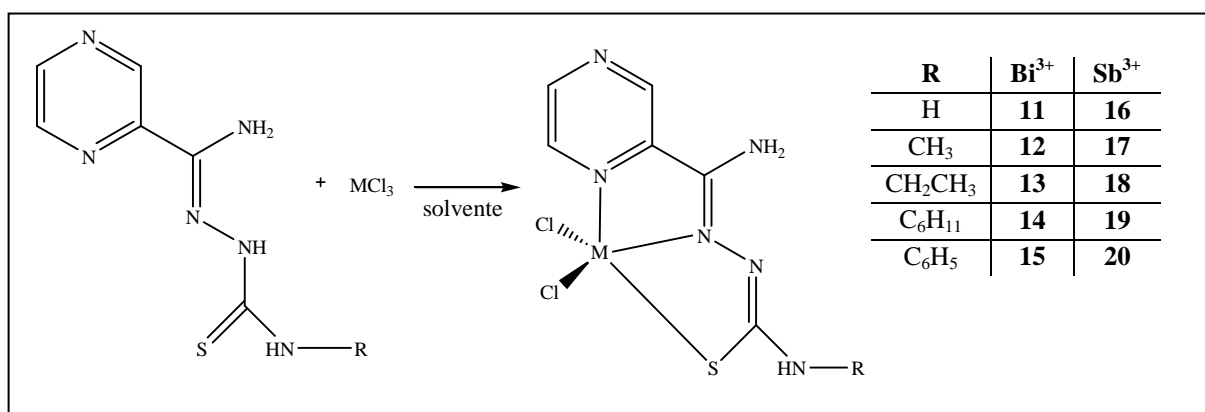
3.3.4–Síntese dos complexos de bismuto(III) e de antimônio(III)

Foram sintetizados cinco novos complexos de antimônio e cinco novos complexos de bismuto com os ligantes tiossemicarbazonas (Figura 22) de acordo com o seguinte procedimento:

A um balão de fundo redondo contendo 1,5 mmol da tiossemicarbazona desejada em 15 mL de metanol seco sob agitação, foi adicionada quantidade equimolar do sal do metal apropriado (BiCl_3 ou SbCl_3). A mistura foi submetida a refluxo por 6 h e permaneceu sob agitação por 24 h. Ao final desse tempo, a mistura foi filtrada em papel de filtro sob vácuo, lavada em metanol e em seguida com éter etílico. O sólido alaranjado obtido foi seco em estufa. A reação de formação dos compostos de bismuto(III) com HPzAm4Cex, HPzAm4Ph e antimônio(III) com HPzAm4Ph foram realizadas em etanol.

Os complexos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, condutivimetria, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia eletrônica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

Figura 22– Esquema de síntese dos complexos de bismuto(III) e antimônio(III) com tiossemicarbazonas derivadas de pirazinamida



Fonte: o autor, 2015.

3.3.5–Aminas e bases de Schiff derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina

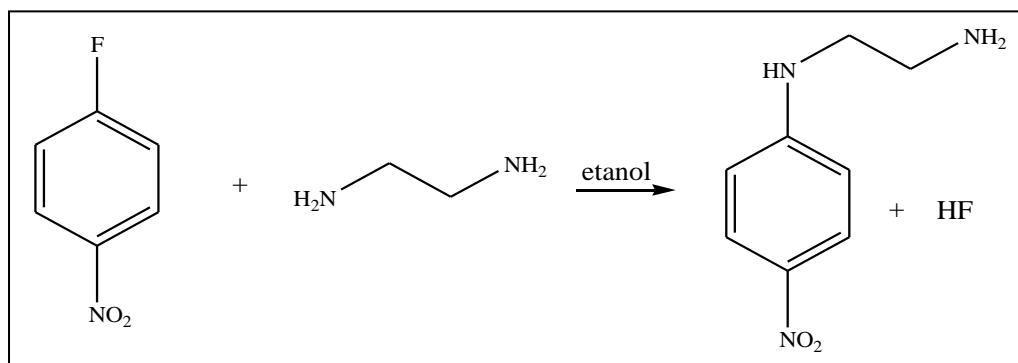
Foram sintetizadas duas aminas e dez iminas inéditas derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina. A confirmação da estrutura dos compostos foi feita através de espectroscopia no IV, RMN de ¹H e ¹³C e espectrometria de massas (ESI–MS). As sínteses foram realizadas no Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz, sob a colaboração do pesquisador Marcus Vinícius Nora de Souza.

Preparo de p-nitrofeniletilenodiamina (21) e N¹, N²-bis(4-nitrofenil)etano-1,2-diamina (22)

Este trabalho iniciou-se com a síntese do precursor *p*-nitrofeniletilenodiamina (**21**) através da reação entre 1-fluoro-4-nitrobenzeno e etilenodiamina (Figura 23), de acordo com o seguinte procedimento:

A um balão contendo 20 mL de etilenodiamina (1,5 mmol) foram adicionados gota a gota 7,2 mL de 1-fluoro-4-nitrobenzeno (1,5 mmol) em 10 mL de etanol. A reação foi mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente, sendo obtido um precipitado amarelo, que foi filtrado e lavado com etanol. Produto foi seco em linha de vácuo.

Figura 23–Esquema de obtenção do composto *p*-nitrofeniletilenodiamina (**21**)

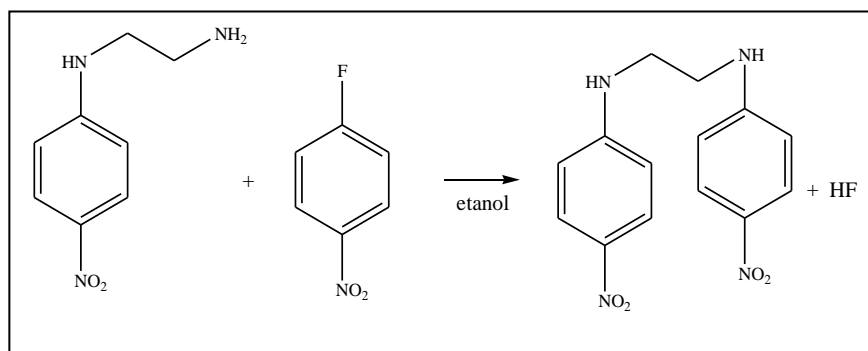


Fonte: o autor, 2015

A síntese da amina *N*¹, *N*²-bis(4-nitrofenil)etano-1,2-diamina (**22**) (Figura 24) foi feita de acordo com o seguinte procedimento:

Em um balão contendo 100 mg (0,6 mmol) da amina (**25**) foram adicionados 10 ml de 1-fluoro-4-nitrobenzeno (0,8 mmol) em 10 ml de etanol. A reação foi mantida sob agitação por 1 h em banho de óleo a 80°C, sendo obtido um precipitado amarelo, que foi filtrado a quente e lavado com etanol. Produto foi seco em linha de vácuo.

Figura 24–Esquema para a reação de obtenção de *N*¹, *N*²-bis(4-nitrofenil)etano-1,2-diamina (**22**)



Fonte: o autor, 2015.

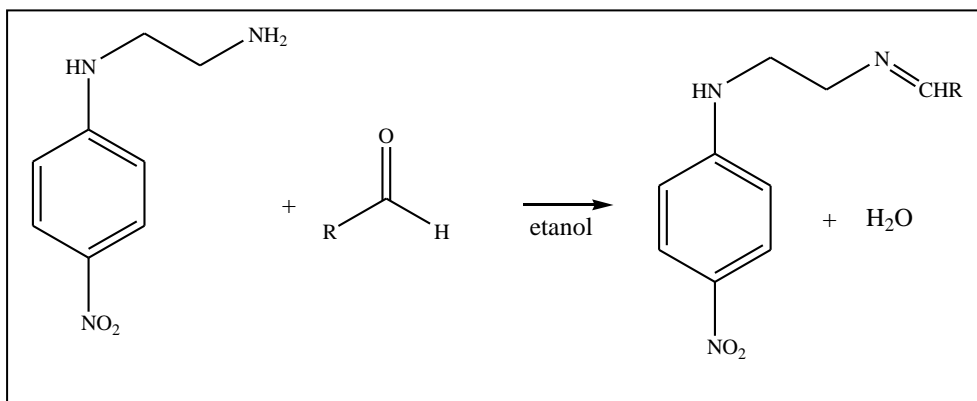
Síntese das bases de Schiff (23–32) derivadas de p-nitrofeniletilenodiamina (21)

O composto *p*-nitrofeniletilenodiamina (**21**) também foi utilizado como precursor para a síntese das iminas de interesse (Figura 25), de acordo com o seguinte procedimento:

A um balão contendo 6×10^{-4} mol da amina (**21**) foi adicionada quantidade equimolar do aldeído apropriado em 10 ml de etanol. A reação foi mantida sob agitação por 1 h, sendo

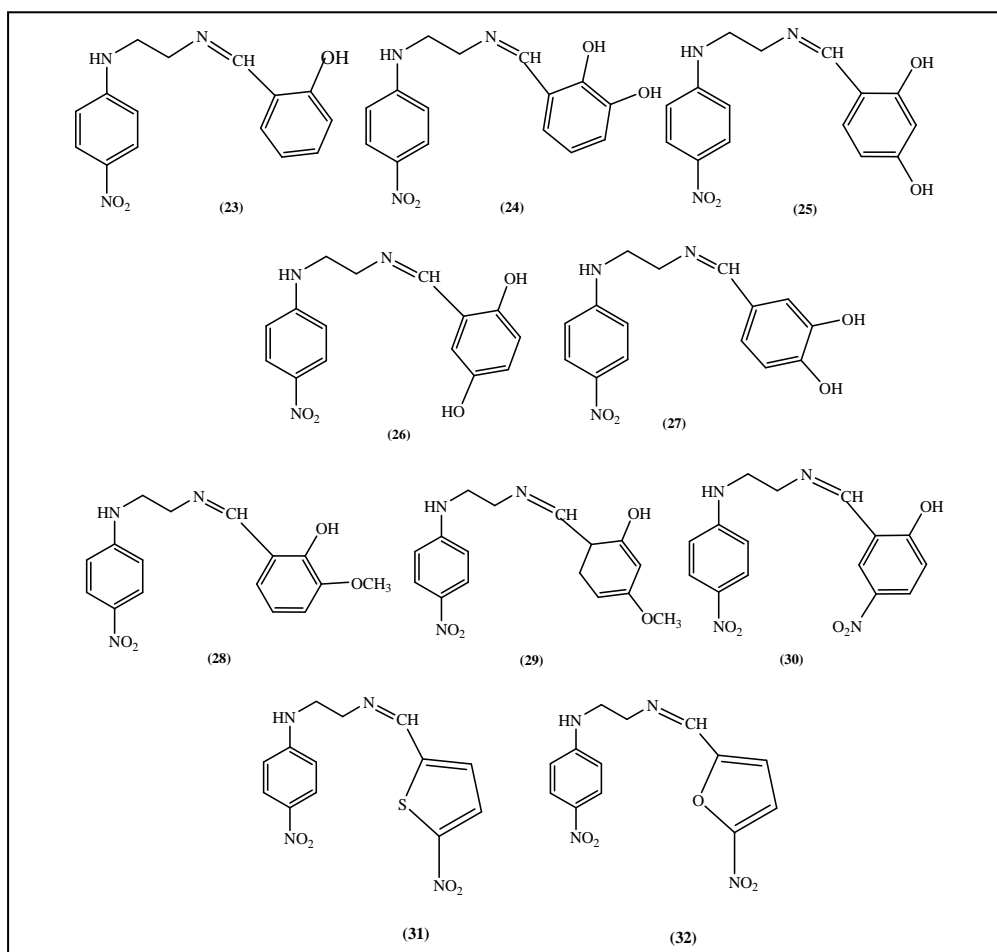
obtidos compostos sólidos que foram filtrados e óleos que foram lavados com etanol. Os produtos foram secos em linha de vácuo. As estruturas das iminas (**23–32**) sintetizadas estão apresentadas na Figura 26.

Figura 25–Esquema de obtenção das iminas derivadas de *p*-nitrofeniletilenodiamina



Fonte: o autor, 2015

Figura 26– Estrutura química das iminas sintetizadas



Fonte: o autor, 2015.

3.4– Avaliação da atividade biológica

3.4.1 –Atividade citotóxica

A avaliação do potencial citotóxico dos compostos de interesse foi realizada no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, através da colaboração da pesquisadora Cláudia Pessoa.

- O método

Os estudos de citotoxicidade foram realizados pelo método do MTT. É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge et al., 1996).

- Linhagens utilizadas

As linhagens tumorais humanas utilizadas, OVCAR-8 (câncer de ovário), HCT-116 (câncer de cólon), SF-295 (glioblastoma) e PC3 (prostata), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

- Estudos com os compostos de interesse

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para a linhagem SF-295 e OVCAR-8 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-116. Cada composto foi previamente dissolvido em DMSO (solução estoque). A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida abaixo de 0,1% (v/v). Os compostos foram incubados, na concentração de 5 µg/mL, com as células por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro leitor de placas a 595nm.

- Determinação do CI_{50}

O CI_{50} consiste da concentração de composto que inibe em 50% a proliferação celular. Os compostos que na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ inibiram em mais de 50% o crescimento celular foram selecionados para determinação do CI_{50} . Para isto, foi empregado novamente o método MTT, sendo que foram utilizadas diferentes concentrações dos compostos (5–0.009 $\mu\text{g/mL}$).

- Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em ao menos três replicatas para cada composto e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento celular (média \pm desvio padrão) *versus* o controle (crescimento celular na ausência do composto), os quais foram calculados utilizando-se o programa GraphPadPrism.

3.4.2 – Atividade antituberculose

A avaliação do potencial antituberculose dos compostos de interesse foi realizada no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz, através da colaboração da pesquisadora Maria Lourenço.

A atividade dos compostos foi avaliada contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294 (Franzblau et al., 1998) usando o ensaio de microplaca Alamar Azul (MABA). Esta metodologia é não tóxica, usa reagente termicamente estável e mostra boa correlação com o método radiométrico BACTEC (Vanitha, Paramasivan, 2004; Reis, 2004). Resumidamente, 200 μL de água deionizada estéril foram adicionados a todos os poços-perímetro exterior de placas estéreis de 96 poços- para minimizar a evaporação do meio nos poços durante a incubação. As placas receberam 100 μL do caldo Middlebrook 7H9 e uma diluição em série dos compostos foi feita diretamente sobre a placa. As concentrações finais dos compostos testados foram de 100 a 3,2 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram cobertas e seladas com parafilme e incubadas a 37° C durante 5 dias. Após este tempo, 25 μL de um preparado fresco de mistura 1:1 de azul de Alamar e reagente 10% de tween 80 foram adicionados à placa e esta foi incubada durante 24 h. A cor azul no poço foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e coloração cor de rosa foi classificada como de crescimento. O resultado foi expresso em termos de concentração inibitória mínima (CIM ou MIC, em inglês), a qual é definida como a menor concentração que impede a mudança de coloração

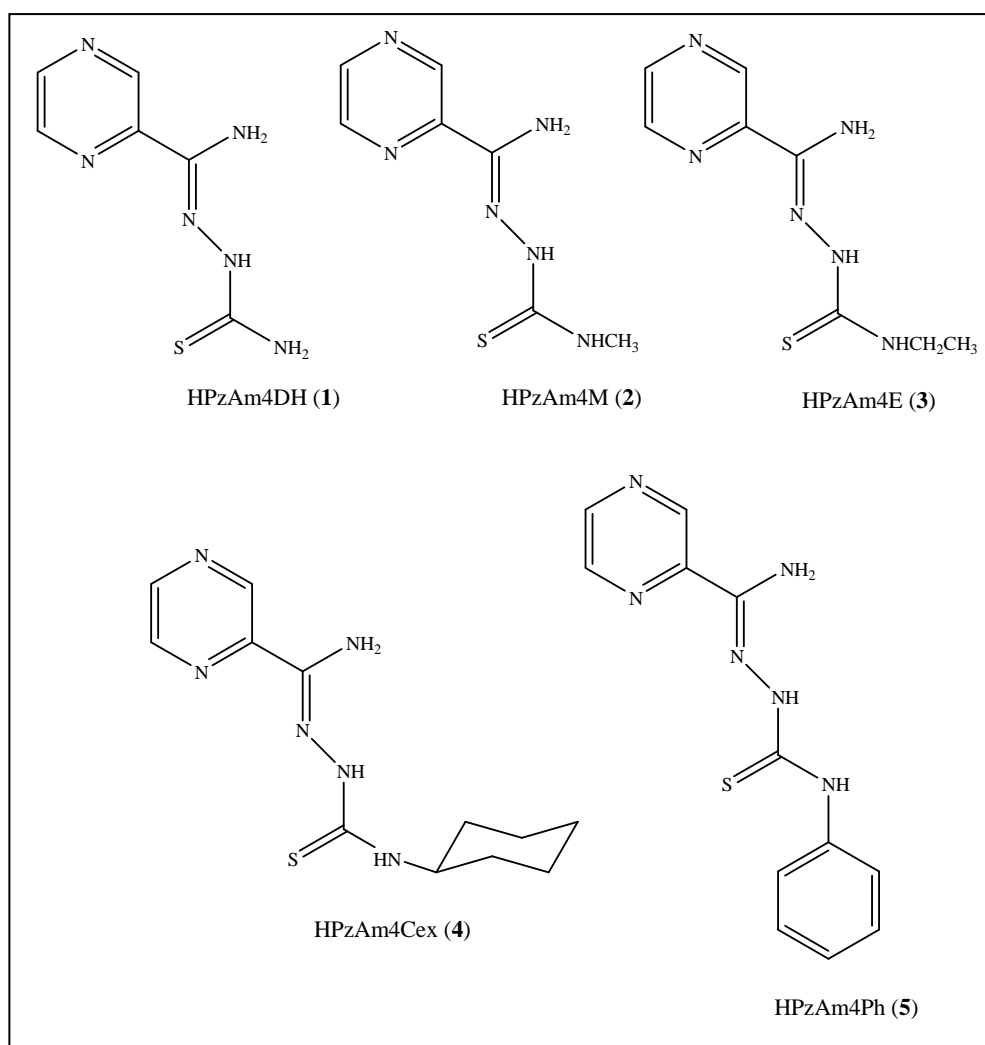
azul para rosa. Os fármacos antituberculose etambutol ou pirazinamida foram utilizados como referência interna.

4 - 2-PIRAZINOFORMAMIDA TIOSSEMICARBAZONA E SEUS DERIVADOS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUBERCULOSE E CONTRA CÉLULAS TUMORAIS

As tiossemicarbazonas são conhecidas por apresentarem diversas bioatividades, como antibacteriana e citotóxica (Beraldo et al., 2004).

Foram sintetizadas as seguintes tiossemicarbazonas, que posteriormente foram estudadas quanto à sua ação contra tuberculose e células tumorais: HPzAm4DH (1), HPzAm4M (2), HPzAm4E(3), HPzAm4Cex (4), HPzAm4Ph (5)(Figura 27). Essas moléculas contêm o grupo farmacofórico da pirazinamida, a qual é um fármaco atualmente utilizado no tratamento de tuberculose.

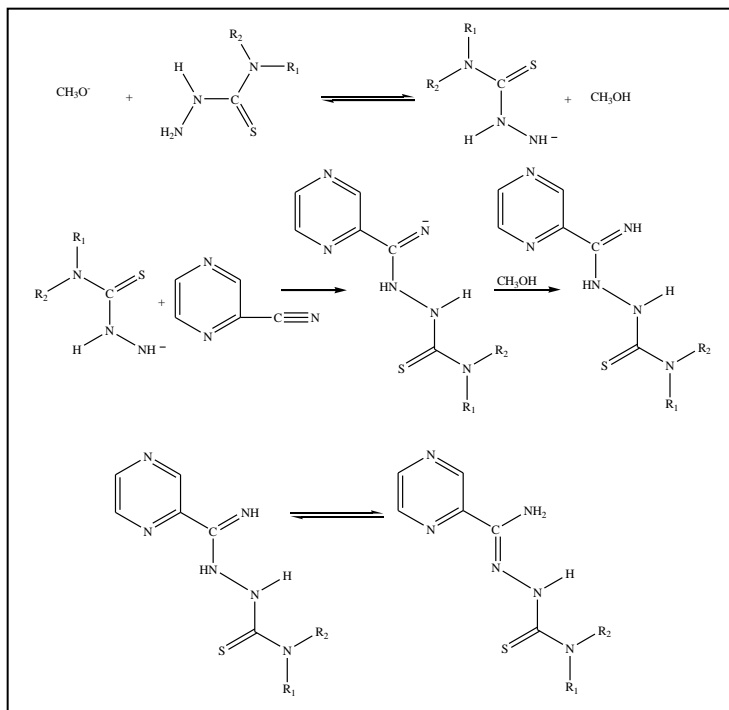
Figura 27– Estruturas das tiossemicarbazonas sintetizadas



Fonte: O autor, 2015.

O mecanismo para a formação das tiossemicarbazonas é mostrado na Figura 28. A reação inicia-se com a desprotonação da tiossemicarbávida pelo metóxido formado na reação com sódio metálico, seguida de ataque nucleofílico do carbono da nitrila.

Figura 28– Mecanismo de reação de formação das tiossemicarbazonas



Fonte: RIOBÓ, 2007

4.1–Caracterização de 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona e seus derivados

A síntese e caracterização por IV, RMN ¹H e ¹³C, UV-vis dos compostos HPzAm4DH (1), HPzAm4M (2), HPzAm4E (3) e difração de raios X por monocristais dos compostos HPzAm4DH e HPzAm4M já foram descritos na literatura (Castiñeiras et al., 2014). Os compostos HPzAm4Cex, HPzAm4Ph são inéditos. Neste capítulo serão apresentadas as caracterizações tanto das moléculas já descritas na literatura, a fim de confirmar sua pureza e obtenção, quanto das moléculas inéditas. Foi determinada a estrutura do composto HPzAm4E (3) por difração de raios X por monocristal e os dados serão apresentados na seção 4.1.5.

As cores, pontos de fusão, massas molares, rendimentos das tiossemicarbazonas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3– Cores, temperaturas de fusão, massas molares e rendimentos de reações para as tiossemicarbazonas

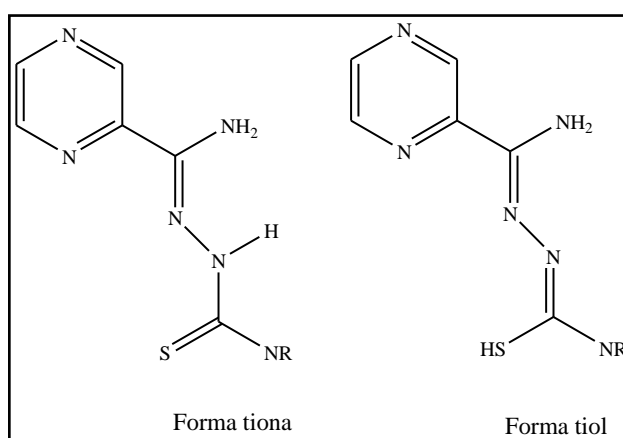
Composto	P.F (°C)	MM (g mol^{-1})	Rendimento (%)
HPzAm4DH	271,1–272,5	196,26	73
HPzAm4M	200,4–202,8	210,26	69
HPzAm4E	186,0–186,1	224,28	51
HPzAm4Cex	206,0–206,3	278,38	52
HPzAm4Ph	196,4–200,3	272,33	85

4.1.1–Espectros no infravermelho

Os espectros no infravermelho das tiossemicarbazonas foram obtidos em pastilha de KBr, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As principais bandas para o entendimento do modo de coordenação das tiossemicarbazonas são apresentadas na Tabela 4.

Os espectros apresentam bandas entre 3460 e 3100 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos dos grupos NH_2 (simétrico e assimétrico) e NH (West, Padhye, Sonawane, 1991; Bermejo et al., 2004; Fostiak et al., 2003). Na região de 2600–2500 cm^{-1} poderia aparecer uma banda correspondente à vibração S–H, caso a tiossemicarbazona estivesse na forma tiol e não em sua forma tiona. A ausência desta banda sugere a existência da forma tautômerica C=S (Figura 29). A presença de bandas em torno de 798–756 cm^{-1} que são atribuídas à vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$ (Costa et al., 2003) confirmam essa proposição.

Figura 29– Possíveis formas tautoméricas tiol/tiona das tiossemicarbazonas



Fonte: O autor, 2015.

A banda devido ao estiramento da ligação C=N normalmente é observada acima de 1500 cm^{-1} (Silverstein, Webster, Kiemle, 2005). Os compostos (1–5) livres apresentam uma banda em torno de 1550 cm^{-1} atribuída a $\nu(\text{C}=\text{N})$.

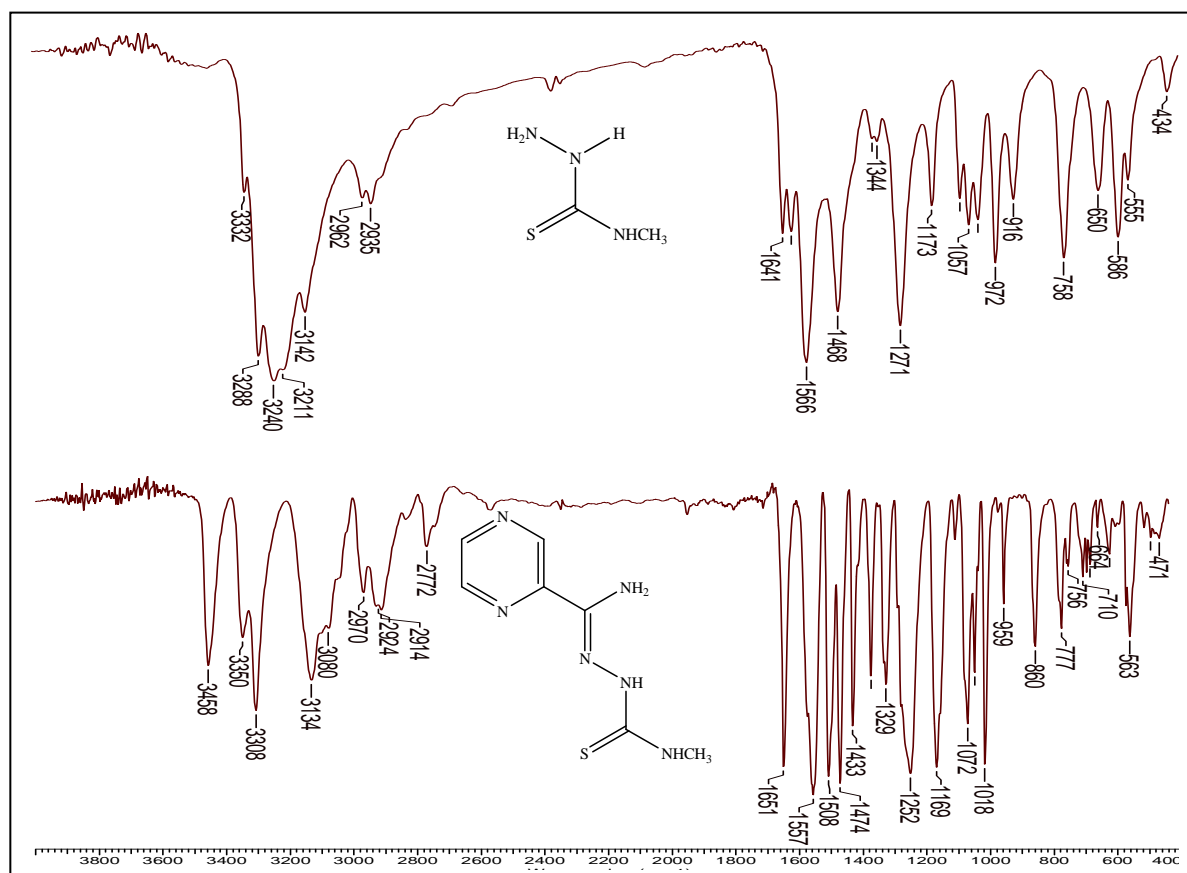
O modo de deformação do anel pirazínico fora do plano deve estar próximo de 600 cm^{-1} (Riobó, 2007). Para as tiossemicarbazonas, essa banda é observada na região de 563 a 594 cm^{-1} . Como exemplo é mostrado na Figura 30 o espectro no IV do composto HPzAm4M (2) em comparação com a tiossemicarbazida precursora. A banda em 3080 cm^{-1} (característica de vibração de CH aromático), está ausente no espectro da tiossemicarbazida, indicando assim a formação da tiossemicarbazona (Silverstein, Webster, Kiemle, 2005).

Tabela 4– Principais bandas no IV (cm^{-1}) da 2-pirazinaformamida tiossemicarbazona e seus derivados N(4)- H, CH₃, CH₂CH₃, C₆H₁₁, C₆H₅

Composto	νNH	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	γCH ou β anel	$\rho(\text{pz})$
HPzAm4DH (1)	3439, 3341, 3289, 3157	1537	799	854	579
HPzAm4M (2)	3458, 3349, 3308, 3134	1557	777	860	563
HPzAm4E (3)	3439, 3343, 3333, 3150	1537	777	856	571
HPzAm4Cex (4)	3443, 3343, 3244, 3142	1539	785	858	592
HPzAm4Ph (5)	3414, 3309, 3275, 3225	1545	745	856	594

Legenda : ν = estiramento, γ = deformação fora do plano, β = deformação anel, ρ = deformação fora do plano

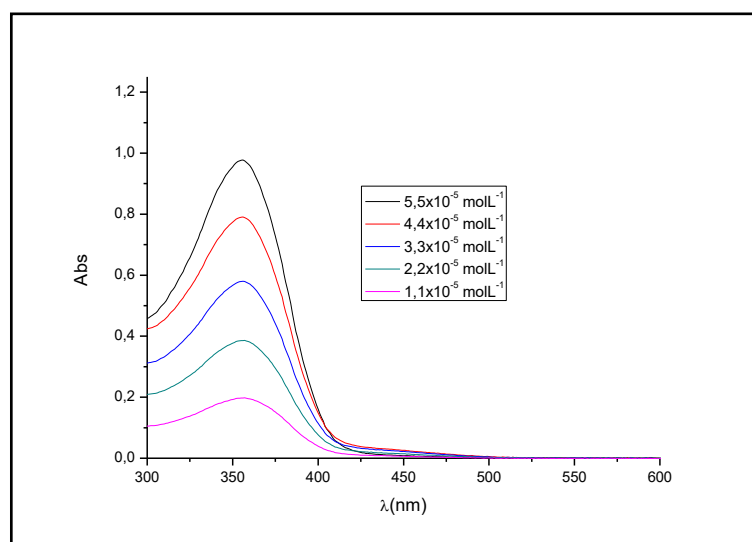
Figura 30– Espectro no IV de N⁴-metil tiossemicarbazida e da tiossemicarbazona HPzAm4M (2), obtidos em pastilha de KBr (4000–400 cm^{-1})



4.1.2–Espectroscopia eletrônica

As tiossemicarbazonas apresentam um máximo de absorção entre 353–356 nm, com coeficiente de absorvidade molar na faixa de $16712\text{--}27860\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Essa banda é atribuída à transição $n\rightarrow\pi^*$ do grupo tioamida equivalentes às encontradas por Martinez et al. (Riobó, 2007). Como exemplo, é mostrado na Figura 31 o espectro eletrônico do composto HPzAm4Ph.

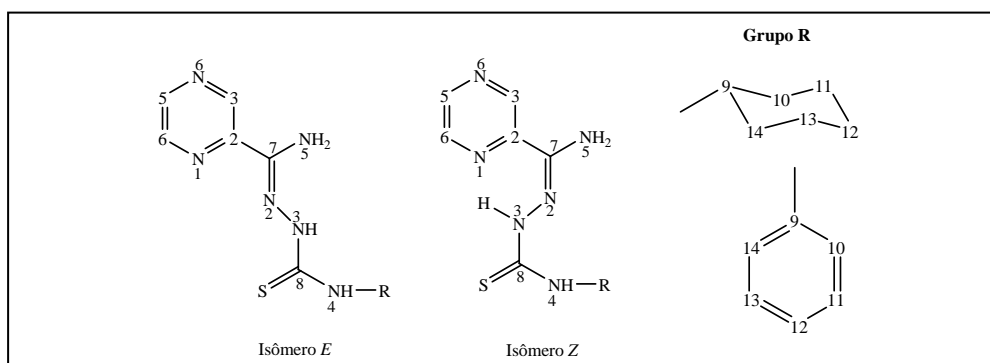
Figura 31– Espectros eletrônicos de HPzAm4Ph (**5**) em dimetilformamida (concentração= $5,5\times 10^{-5}\text{ molL}^{-1}$ a $1,1\times 10^{-5}\text{ molL}^{-1}$)



4.1.3–Ressonância Magnética Nuclear

Em todos os espectros de RMN das substâncias sintetizadas foram observados os sinais de hidrogênio e carbono consistentes com os grupos R. As atribuições para os sinais de ^1H e de ^{13}C das moléculas encontram-se nas Tabelas 5 e 6. Para todas as tiossemicarbazonas estudadas foi verificada a presença de sinais atribuídos ao isômero configuracional *E*. A numeração usada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das tiossemicarbazonas e as estruturas dos isômeros configuracionais *E* e *Z* estão representados na Figura 32.

Figura 32 –Numeração utilizada para atribuição dos átomos de hidrogênio e de carbono das tiossemicarbazonas e seus isômeros configuracionais *E* e *Z*.

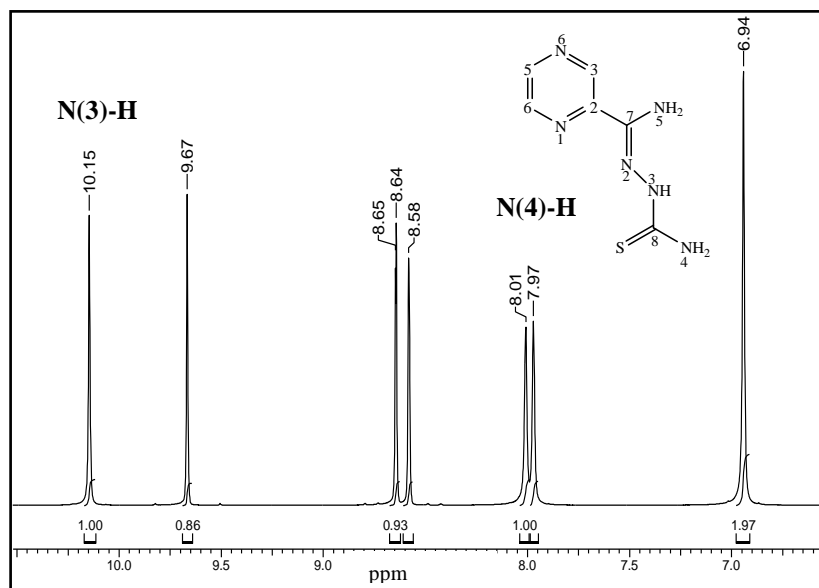


Fonte: O autor, 2015.

A identificação dos isômeros *E* e *Z* pode ser feita com base no deslocamento químico do sinal de N(3)-H nos espectros de RMN de ^1H . No isômero *Z* este hidrogênio amínico torna-se mais desblindado e seu sinal é observado na faixa de 12–15 ppm (Costa et al., 2003). Este fato é explicado pela ligação de hidrogênio entre N(3)-H e o nitrogênio pirazínico. No isômero *E* essa ligação de hidrogênio não pode se formar, neste caso o sinal de N(3)-H encontra-se mais blindado, ocorrendo em 10,06-10,88 ppm. A presença desse isômero é exemplificada pelo espectro de RMN de ^1H de HPzAm4DH (Figura 33).

O caráter parcialmente duplo da ligação C(8)-N(4) em HPzAm4DH pode também ser facilmente evidenciado pelo RMN de ^1H , uma vez que os hidrogênios em N(4)H₂ aparecem como dois sinais não equivalentes. Isso acontece devido à rotação restrita da ligação C-NH₂ por conta da dupla ligação parcial. (Tarasconi et al., 2000; Jouad et al., 2001).

Figura 33– Espectro de RMN de ^1H de HPzAm4DH (**1**), obtido em $\text{DMSO-}d_6$



Os espectros de RMN de ^{13}C indicam que as moléculas encontram-se na forma de tiona, cujos deslocamentos químicos referentes a $\text{C}=\text{S}$ encontram-se mais desblindados do que se os compostos estivessem na forma C-S de tiol (Lessa et al., 2010). Na Figura 34 é apresentado, como exemplo, o espectro de RMN de ^{13}C de HPzAm4Ph. Demais espectros de RMN referentes a outras técnicas, como COSY, APT e HSQC são mostrados nos Apêndice C.

Figura 34– Espectro de RMN de ^{13}C de HPzAm4Ph (**5**), obtido em $\text{DMSO-}d_6$, ampliado na região entre 115 e 190 ppm.

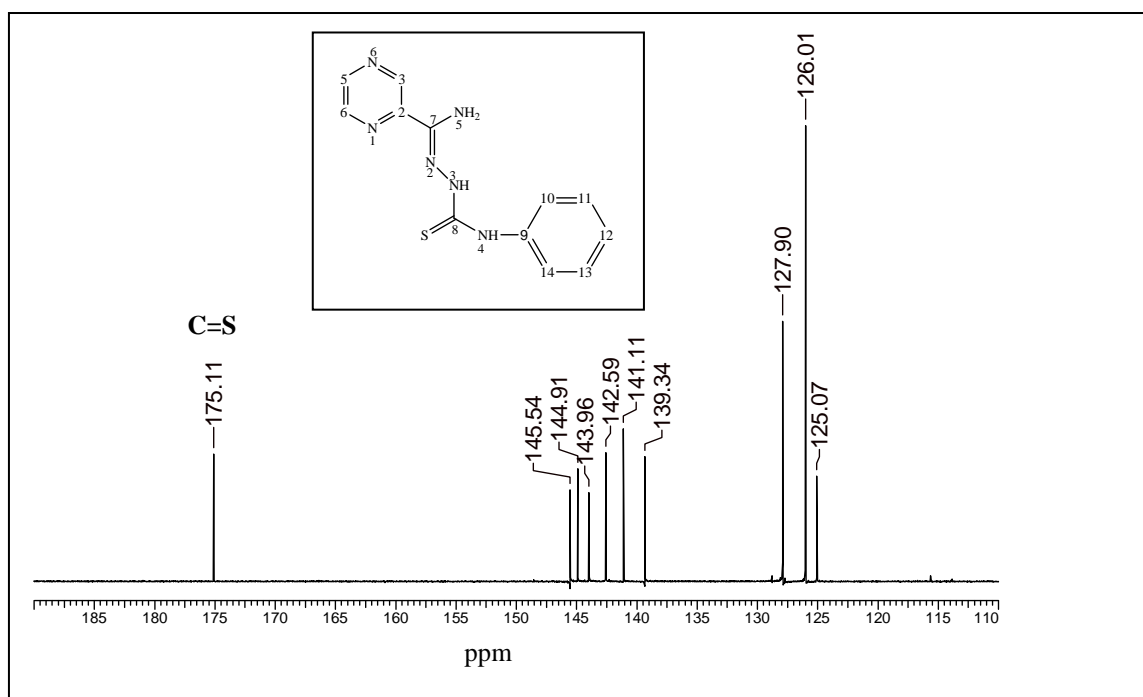


Tabela 5– Atribuição (A), número de hidrogênios (N^o), deslocamento químico (δ), multiplicidade^a, constante de acoplamento (J,Hz) dos sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas 1–5

A	N ^o	δ (ppm)				
		HPzAm4DH (1)	HPzAm4M (2)	HPzAm4E (3)	HPzAm4Cex (4)	HPzAm4Ph (5)
N(5)H	2	6,94 (s)	6,92 (s)	6,94 (s)	6,97(s)	7,14(s)
N(4)H	1	8,01 (s)	8,43 (q) J= 4,4	8,49 (t) J= 6,0	7,94(d) J= 8,7	10,01(s)
N(4)H	1	7,97 (s)				
N(3)H	1	10,15 (s)	10,17 (s)	10,09 (s)	10,06(s)	10,52 (s)
C(3)H	1	9,67 (s)	9,71 (d) J= 1,8	9,71 (d) J= 1,8	9,64(d) J= 1,4	9,85 (d) J= 1,4
C(5)H	1	8,58 (s)	8,59 (dd) J= 1,8; 2,7	8,59(dd) J= 1,8; 2,7	8,61(dd) J= 2,5; 1,4	8,63 (dd) J= 1,4; 2,8
C(6)H	1	8,64 (d) J= 2,3	8,65 (d) J= 2,7	8,66(d) J= 2,7	8,68(d) J= 2,3	8,69 (d) J= 2,8
CH ₃	3		3,02 (d) J= 4,5	1,14(t) J= 7,1		
CH ₂	2			3,60(m)		
C(9)H	1				4,22(m)	
C(10)Ha	1				1,48(q) J= 12,1; 3,32	7,57 (m)
C(10)He	1				1,85(d) J= 9,7	
C(11)Ha	1				1,28(m)	7,36 (m)
C(11)He	1				1,74(d) J= 13,3	
C(12)Ha	1				1,14(m)	7,19 (m)
C(12)He	1				1,16(d) J= 12,9	
C(13)Ha	1				1,28(m)	
C(13)He	1				1,74(d) J= 13,3	
C(14)Ha	1				1,48(q) J= 12,1; 3,32	
C(14)He	1				1,85(d) J= 9,7	

Legenda:^aMultiplicidade: s = simpleto; d = duplete; dd= duplo duplete; t = triplete; q = quadruplete; m = multiplete; a = axial; e = equatorial

Tabela 6– Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas 1–5

A	δ (ppm)				
	HPzAm4DH (1)	HPzAm4M (2)	HPzAm4E (3)	HPzAm4Cex (4)	HPzAm4Ph (5)
C5	142,50	142,54	142,55	142,58	142,59
C3	143,70	143,63	143,63	143,48	143,96
C6	144,68	144,58	144,60	144,67	144,91
C7=N	140,46	140,19	140,25	140,50	141,11
C8=S	176,96	177,09	176,02	174,99	175,11
C2	145,77	145,82	145,80	145,68	145,54
CH ₂			38,18		
CH ₃		30,81	14,83		
C(9)				52,50	127,90
C(10)/C(14)				31,82	126,01
C(11)/C(13)				25,00	125,07
C(12)				25,16	130,34

4.1.4–Espectrometria de massas

Com o intuito de confirmar a composição das tiossemicarbazonas sintetizadas realizou-se o estudo através de espectrometria de massas com ionização por *electrospray*. Todos os compostos foram solubilizados em MeOH e os espectros adquiridos no modo negativo. A Tabela 7 apresenta os dados de ESI-MS para estas substâncias.

Tabela 7– Dados de ESI–MS para o íon molecular das tiossemicarbazonas 1–5

Composto	m/z	m/z	IR(%)*	Atribuição
	experimental	teórico	do íon molecular	
HPzAm4DH (1)	195,1	195,0	100	C ₆ H ₇ N ₆ S ⁻
HPzAm4M (2)	209,0	209,1	100	C ₇ H ₉ N ₆ S ⁻
HPzAm4E (3)	223,0	223,1	19	C ₈ H ₁₁ N ₆ S ⁻
HPzAm4Cex (4)	277,1	277,1	13	C ₁₂ H ₁₇ N ₆ S ⁻
HPzAm4Ph (5)	270,9	271,1	100	C ₁₂ H ₁₁ N ₆ S ⁻

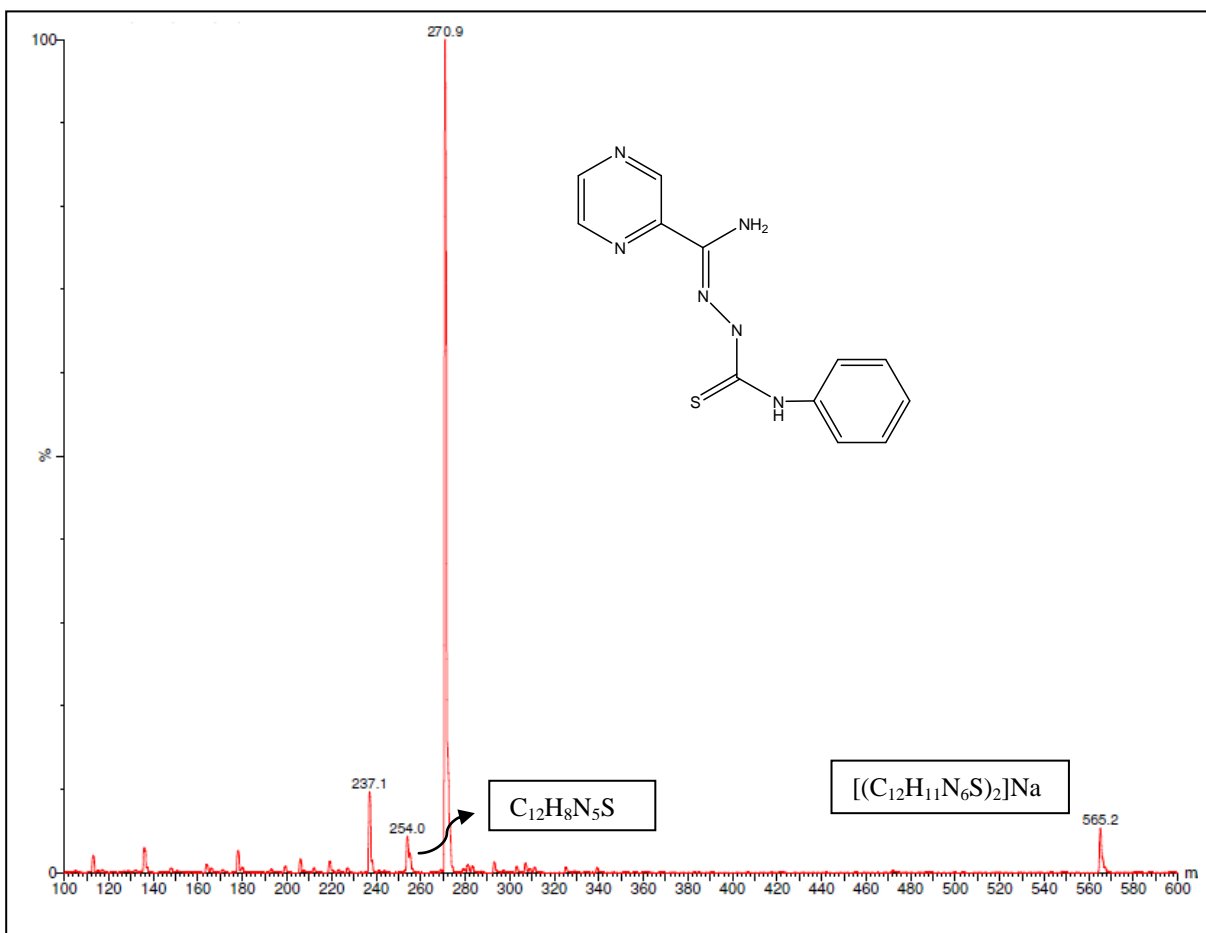
* IR = intensidade relativa, dada em %.

Em todos os espectros observa-se o pico correspondente ao íon molecular das tiossemicarbazonas. Este pico tem uma intensidade elevada o que nos sugere uma elevada estabilidade desses compostos, com exceção dos compostos HPzAm4E e HPzAm4Cex que apresentaram uma menor intensidade.

As tiossemicarbazonas sintetizadas apresentam um sistema de fragmentação similar, sendo comum a formação de adutos com íon sódio e a perda de grupos como NH₃ ou os

substituintes ligados a N(5). Na Figura 35 temos um exemplo da fragmentação de HPzAm4Ph.

Figura 35– Espectro de massas (ESI-MS) em metanol de HPzAm4Ph, obtido no modo negativo



4.1.5–Estrutura cristalográfica

Detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritas nos capítulos e nos apêndices. A estrutura determinada para o composto e a numeração proposta estão apresentadas na Figura 36 e 37. As distâncias e ângulos de ligação encontram-se nas tabelas 8 e 9. Na tabela 10 são apresentadas as ligações de hidrogênio para o composto HPzAm4E. A distância da ligação C–S para o composto HPzAm4E se situa em 1,68 Å, sendo notavelmente mais curta que a distância de uma ligação simples C–S (1,82 Å) mas sendo maior que uma ligação dupla (1,56 Å), devido a uma conjugação do sistema (Urriaga, 1995). Isto significa que existe um caráter parcial de ligação dupla, sugerindo que o composto esteja na forma de

tiona. O mesmo ocorre para a ligação C–N (1,36 Å), em que a distância é mais curta que C(sp²)–N que seria de 1,46 Å, que indica um caráter parcial de dupla ligação

O composto HPzAm4E adota a conformação *EE* em relação às ligações C(7)–N(2) e N(3)–C(8) como resultado da ligação de hidrogênio intramolecular N(4)–H(4)⋯N(2). A análise mostra que a molécula é muito perto de ser plana, com ângulo de 16,11(4)° entre o esqueleto da tiossemicarbazona e o grupo pirazina.

A ligação de hidrogênio N(3)–H(3)⋯N(6) é a mais relevante interação no empacotamento cristalino. Esta interação é responsável pela formação de uma cadeia supramolecular 1D, que estende do eixo cristalográfico - b (Figura 37). No arranjo supramolecular, observam-se também os dímeros inversos, como resultado da interação de N(5)–H(5B)⋯S1.

Figura 36– Diagrama de Ortep de HPzAm4E (2)

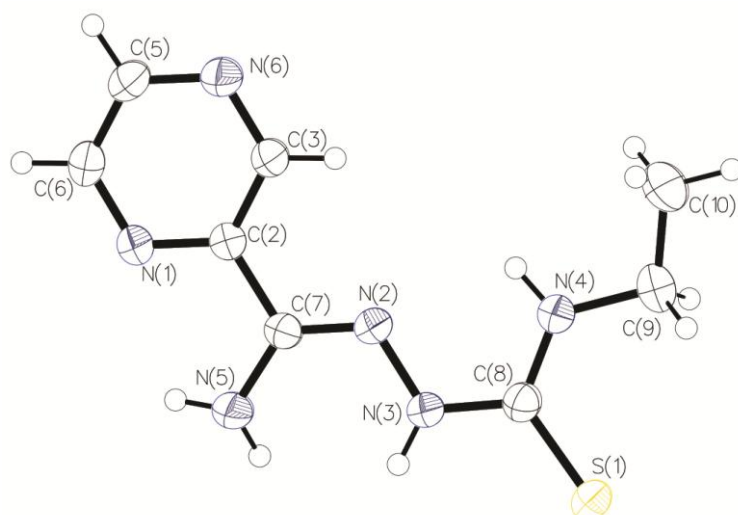


Figura 37– Ligação de hidrogênio do composto HPzAm4E (2) ao longo do eixo b

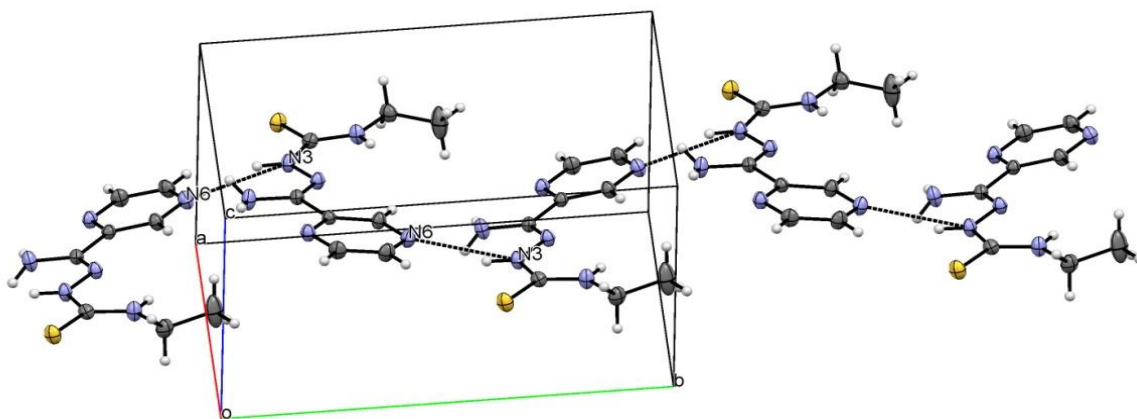


Tabela 8– Distâncias de ligação selecionadas (Å) de HPzAm4E (2)

Ligação	HPzAm4E	Ligação	HPzAm4E
S(1)–C(8)	1,6765(17)	N(6)–C(5)	1,337(2)
N(1)–C(6)	1,335(2)	N(6)–C(3)	1,327(2)
N(1)–C(2)	1,331(2)	N(5)–C(7)	1,359(2)
N(2)–N(3)	1,3889(19)	C(5)–C(6)	1,374(3)
N(2)–C(7)	1,283(2)	C(2)–C(7)	1,483(2)
N(3)–C(8)	1,359(2)	C(2)–C(3)	1,389(2)
N(4)–C(8)	1,323(2)	C(9)–C(10)	1,475(3)
N(4)–C(9)	1,456(2)		

Tabela 9– Ângulos de ligação selecionados (°) de HPzAm4E (2)

Átomos	HPzAm4E	Átomos	HPzAm4E
C(2)–N(1)–C(6)	116,08(15)	C(3)–C(2)–C(7)	121,65(15)
C(7)–N(2)–N(3)	117,19(14)	N(2)–C(7)–N(5)	126,92(16)
C(8)–N(3)–N(2)	116,93(14)	N(2)–C(7)–C(2)	116,54(14)
C(8)–N(4)–C(9)	125,40(16)	N(5)–C(7)–C(2)	116,48(15)
C(3)–N(6)–C(5)	115,65(16)	N(3)–C(8)–S(1)	120,73(13)
N(6)–C(5)–C(6)	122,26(17)	N(4)–C(8)–S(1)	123,64(14)
N(1)–C(6)–C(5)	122,06(17)	N(4)–C(8)–N(3)	115,62(15)
N(1)–C(2)–C(7)	116,79(15)	N(4)–C(9)–C(10)	110,04(17)
N(1)–C(2)–C(3)	121,55(15)	N(6)–C(3)–C(2)	122,37(16)

Tabela 10–Parâmetros de ligação de hidrogênio em HPzAm4E (2)

D—H···A	D—H	H···A	D···A	D—H···A
N4—H4···N2	0,86	2,15	2,564 (2)	109
N3—H3···N6 [−x+1/2, y−1/2, −z+3/2]	0,86	2,34	3,119 (2)	151
N5—H5A···N1	0,85	2,28	2,692 (2)	110 (2)
N5—H5B···S1 [−x, −y+1, −z+1]	0,85	2,70	3,364 (2)	136 (2)

4.2–Atividade biológica das tiossemicarbazonas

4.2.1–Atividade citotóxica

As tiossemicarbazonas sintetizadas foram testadas quanto à atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas OVCAR–8 (câncer de ovário), HCT–116 (câncer de cólon) e SF–295 (glioblastoma).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 3.3.5. Os resultados, expressos em porcentagem de inibição de crescimento, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11–Inibição do crescimento de células tumorais causada pelas tiossemicarbazonas 1–5

Composto	% de inibição do Crescimento (média ± desvio padrão)		
	HCT–116	OVCAR–8	SF–295
HPzAm4DH (1)	37,05±4,49	7,74±3,87	17,67±0,22
HPzAm4M (2)	11,19±5,96	23,67±10,09	24,44±1,58
HPzAm4E (3)	44,72±14,27	52,60±8,43	-7,64±42,77
HPzAm4Cex (4)	-10,30±8,25	6,17±5,00	39,10±0,49
HPzAm4Ph (5)	15,36±6,77	19,47±4,01	29,02±1,15

De um modo geral os valores da atividade biológica sugerem que as tiossemicarbazonas não apresentam uma atividade significativa (% de inibição de crescimento maior que 50) contra as linhagens de células tumorais testadas.

4.2.2–Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*

Foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana das tiossemicarbazonas HPzAm4DH, HPzAm4M, HPzAm4E, HPzAm4Cex, HPzAm4Ph (1–5) contra *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados obtidos estão na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação da atividade antimicrobacteriana das tiossemicarbazonas 1–5

Composto	100 µg / mL	50 µg / mL	25 µg / mL	12,5 µg / mL	6,25 µg / mL	3,12 µg / mL
HPzAm4DH (1)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4H (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4E (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4Cex (4)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4Ph (5)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
Res- Resistente						

Estudo da ação das tiossemicarbazonas frente a *M. tuberculosis* indicam que estes compostos não são ativos nas concentrações entre 100 e 3,2 µg/mL, embora apresentem o grupo farmacofórico pirazinamida, a qual é um dos principais fármacos utilizados no tratamento de tuberculose. Vale salientar que o próprio fármaco apresenta baixa atividade no teste empregado, o que sugere que a metodologia utilizada não é adequada para investigar a atividade desses compostos.

5–COMPLEXOS DE GÁLIO(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 2-PIRAZINOFORMAMIDA

Neste capítulo serão apresentadas as caracterizações e resultados de estudos biológicos realizados para complexos de gálio(III) sintetizados com 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona (**1**) e seus derivados *N*⁴-metil-, etil-, cicloexil-efenil- (**2–5**). Os complexos foram analisados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar (Tabela 13), espectroscopias no infravermelho e eletrônica, ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, APT e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI–MS).

5.1– Caracterização dos complexos de gálio(III)

5.1.1 –Características gerais, microanálises e condutividade molar

Os dados de análises elementares fornecem uma indicação de suas fórmulas moleculares que por sua vez são condizentes com as estruturas propostas. À partir dessa análise, foi proposta a composição dos complexos contendo Ga³⁺, L⁻ (tiossemicarbazona desprotonada) e nitrato na proporção 1:2:1. Para algumas estruturas também foi proposta a presença de água de hidratação. Medidas de condutividade elétrica molar estão acima de 65 e abaixo de 90 ohm⁻¹cm²mol⁻¹, o que sugere que todos os compostos são eletrólitos 1:1 (Geary, 1971), e, portanto o íon nitrato estaria atuando como contra-íon. Dessa forma, os dados sugerem a formação de complexos do tipo [Ga(L)₂]NO₃. No processo de obtenção do complexo (**6**), também ocorre a ciclização da tiossemicarbazona (**1**), o que será discutido mais adiante. Portanto, para o produto dessa síntese, serão mostrados apenas resultados de análises de RMN e de espectrometria de massas.

Tabela 13– Rendimento (R), ponto de fusão^a, massa molar (MM), análise elementar^b e condutividade molar^c (DMF, 1×10^{-3} mol L⁻¹) dos complexos de gálio(III)

Composto	R (%)	P.F (°C)	MM (g mol ⁻¹)	%C	%H	%N	ΔM
[Ga(PzAm4M) ₂] ₂ NO ₃	24	257,7–258,0 (200,4–202,8)	550,23	30,33 (30,56)	3,33 (3,30)	32,55 (33,09)	63,4
[Ga(PzAm4E) ₂] ₂ NO ₃ ·2H ₂ O	27	223,7–224,4 (186,0–186,1)	614,32	31,51 (31,28)	4,19 (4,27)	29,70 (29,64)	75,9
[Ga(PzAm4Cex) ₂] ₂ NO ₃ ·3H ₂ O	35	240,1–241,0 (206,0–206,3)	740,51	38,83 (38,93)	5,22 (5,44)	24,03 (24,59)	81,0
[Ga(PzAm4Ph) ₂] ₂ NO ₃ ·H ₂ O	37	267,9–269,1 (196,4–200,3)	692,39	41,71 (41,63)	3,25 (3,49)	26,28 (26,30)	65,8

Legenda: ^aPonto de fusão das tiossemicarbazonas livres encontram-se entre parêntesis; ^bValores teóricos entre parêntesis; ^cOhm⁻¹·cm²·mol⁻¹

5.1.2–Espectroscopia no Infravermelho

As principais bandas nos espectros no infravermelho dos compostos de gálio(III) são apresentados na Tabela 14. As vibrações atribuídas a $\nu(\text{C}=\text{N})$ em 1508–1545 cm⁻¹ nos espectros no IV das tiossemicarbazonas livres deslocam-se para 1514–1559 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, estando de acordo com a coordenação da tiossemicarbazona ao gálio por meio do nitrogênio imínico (Ismail et al., 2013).

Tabela 14– Principais bandas no IV (cm^{-1}) dos complexos de gálio(III)

Complexos	νNH_2	$\nu(\text{NO}_3)$	$\pi(\text{NO}_3)$	$\delta(\text{NO}_3)$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	γCH ou β_{anel}	$\rho(\text{pz})$
HPzAm4M (2)	3458, 3349, 3308, 3134				1508	777	860	563
[Ga(PzAm4M) ₂] ₂ NO ₃ (7)	3393, 3256, 3142,3049	1385	843	755	1537	756	868	602
HPzAm4E (3)	3439, 3343, 3333, 3150				1537	777	856	571
[Ga(PzAm4E) ₂] NO ₃ ·2H ₂ O (8)	3366, 3277, 3229, 3186	1383	841	760	1570	759	872	610
HPzAm4Cex (4)	3443, 3343, 3244, 3142				1539	785	858	592
[Ga(PzAm4Cex) ₂] ₂ NO ₃ ·3H ₂ O (9)	3428, 3318, 3276, 3152	1394	845	744	1580	761	852	627
HPzAm4Ph (5)	3414, 3309, 3275, 3225				1545	762	860	594
[Ga(PzAm4Ph) ₂] ₂ NO ₃ ·H ₂ O (10)	3355, 3312, 3273, 3243	1382	852	760	1591	752	881	631

Legenda: ν = estiramento; π , γ = deformação fora do plano; δ , β = deformação anel; ρ = deformação fora do plano

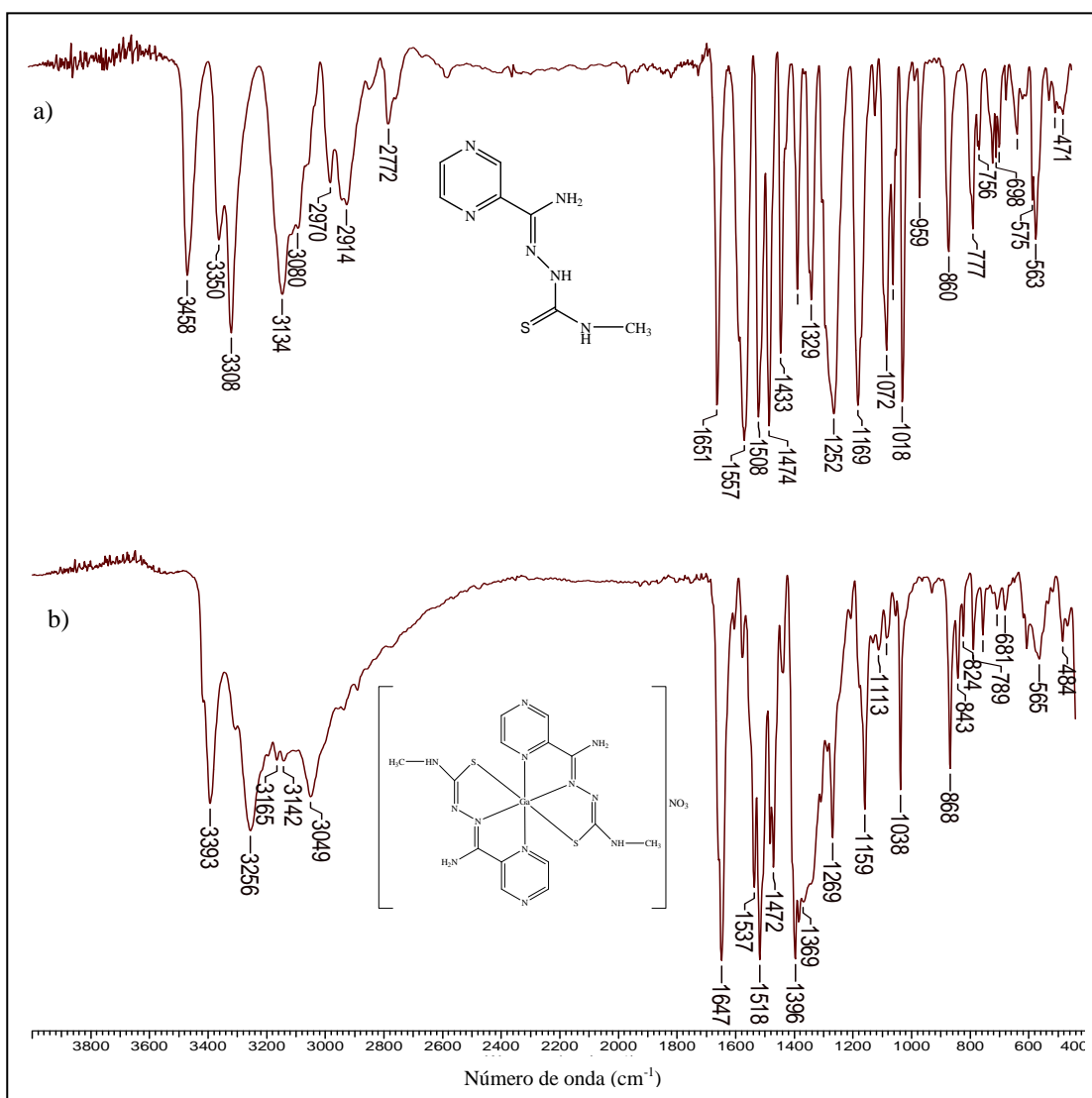
A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em 762–799 cm^{-1} nos espectros das bases livres, desloca-se para 752–761 cm^{-1} nos espectros dos complexos **7-10**, sugerindo a coordenação pelo enxofre. O pequeno deslocamento sugere a ligação do enxofre ao metal na forma de um tiolato, ou seja, as tiossemicarbazonas encontram-se desprotonadas no N(3) nos complexos (Kumar et al., 2014).

A banda correspondente ao modo de deformação do anel pirazínico fora do plano $\rho(\text{py})$ situada na região de 563–594 cm^{-1} nas tiossemicarbazonas livres está situada a frequências maiores nos complexos metálicos (602–631 cm^{-1}), o que seria indicativo da coordenação do ligante ao metal através do nitrogênio pirazínico (Mendes et al., 2009).

Também foram observados nas regiões de 1382·1394 cm^{-1} , 841·852 cm^{-1} e 744–760 cm^{-1} , absorções características dos modos estiramento, deformação fora do plano e deformação no plano, respectivamente, do grupo nitrato não coordenado (Nakamoto, 1986). Esses dados sugerem a presença de nitrato na estrutura dos compostos, como também indicam que este grupo atua como contra-íon.

Na Figura 38 são apresentados como exemplo, os espectros no infravermelho da tiossemicarbazona HPzAm4M (**2**) e do complexo $[\text{Ga}(\text{PzAm4M})_2] \text{NO}_3$ (**7**).

Figura 38–Espectros no infravermelho a) da tiossemicarbazona HPzAm4M (**2**) e b) do complexo $[\text{Ga}(\text{PzAm4M})_2] \text{NO}_3$ (**7**), obtidos em KBr, na região de $4000\text{--}400\text{cm}^{-1}$



5.1.3 –Espectroscopia eletrônica

Para se confirmar a complexação e caracterizar os produtos sintetizados, realizou-se a leitura da absorção no UV-Vis, em DMF grau espectroscópico, para cada composto e para as tiossemicarbazonas. Determinou-se o comprimento de onda de absorção máxima e calculou-se a absorvidade molar (ϵ) de cada espécie (Tabela 15).

Tabela 15 –Bandas^a observadas nos espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas e complexos de gálio(III) em DMF e seus respectivos valores de ϵ .

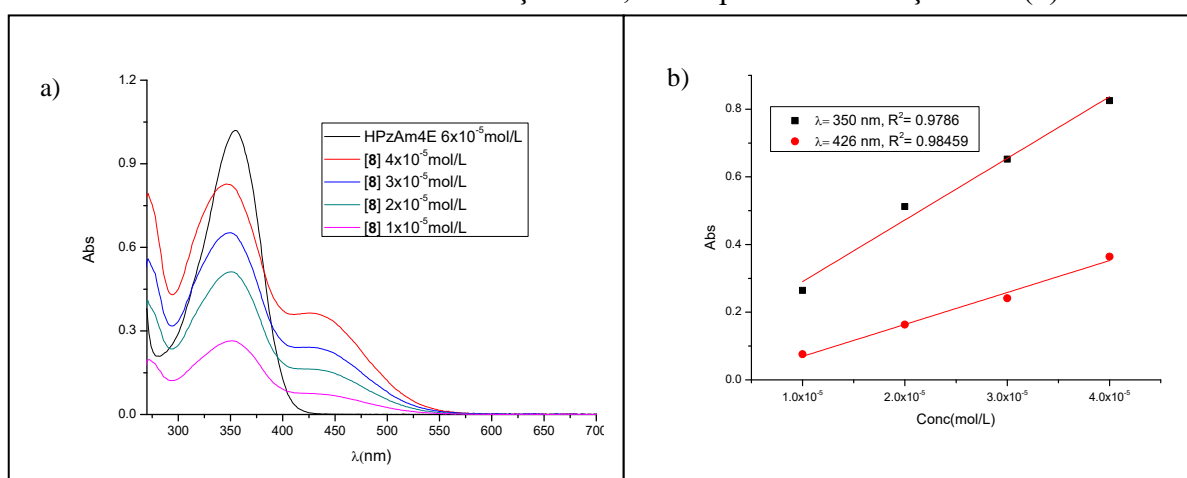
Complexos	Banda I	Banda II
HPzAm4M (2)	354(16712)	
[Ga(PzAm4M) ₂] ₂ NO ₃ (7)	349(17352)	427(9393)
HPzAm4E (3)	355(16725)	
[Ga(PzAm4E) ₂] ₂ NO ₃ ·2H ₂ O (8)	350(18219)	426(9439)
HPzAm4Cex (4)	355(17826)	
[Ga(PzAm4Cex) ₂] ₂ NO ₃ ·3H ₂ O (9)	345(27860)	433(16187)
HPzAm4Ph (5)	356(17867)	
[Ga(PzAm4Ph) ₂] ₂ NO ₃ ·H ₂ O (10)	349(26706)	434(17753)

Legenda:^aComprimento de onda(λ) em nm. ^bCoefficiente de absorvidade molar (ϵ) entre parênteses, em $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

O espectro eletrônico das tiossemicarbazonas em DMF apresenta uma banda de absorção relacionada com as transições $n \rightarrow \pi^*$ em 355 nm, denominada banda I, dos grupos azometino e tioamida das tiossemicarbazonas (Riobó, 2007).

Os espectros na região do UV-Vis em DMF mostram diferenças significativas entre as tiossemicarbazonas e os complexos, conforme pode ser observado nos espectros da tiossemicarbazona HPzAm4E (3) e do complexo [Ga(PzAm4E)₂]₂NO₃·2H₂O (8) (Figura 39).

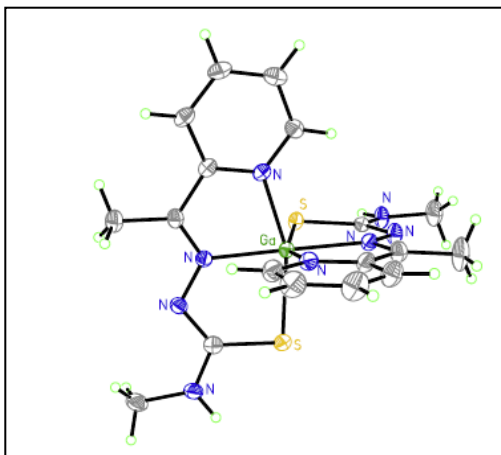
Figura 39–Espectro eletrônico de HPzAm4E (3) e [Ga(PzAm4E)₂]₂·2H₂O (8) (a) e curva de absorvância *versus* concentração de 8, usada para determinação de ϵ (b)



Observa-se claramente a coordenação ao centro metálico: verificam-se o deslocamento hipsocrômico da banda I e o surgimento de uma nova banda entre 426 e 434 nm. Nos complexos hexacoordenados, o gálio(III) possui um ambiente octaédrico ou octaédrico

distorcido (Bandoli et al., 2009). Há relatos na literatura de outros complexos de gálio com tiossemicarbazonas que demonstram esse mesmo perfil espectral (Chan et al., 2010; Enyedy et al., 2015), como, por exemplo, o composto mostrado na Figura 40.

Figura 40– Estrutura de íon complexo de gálio(III) com tiossemicarbazona: $[Ga(L)_2]NO_3$ (L=2-acetilpiridina *N*⁴-metil tiossemicarbazonato)

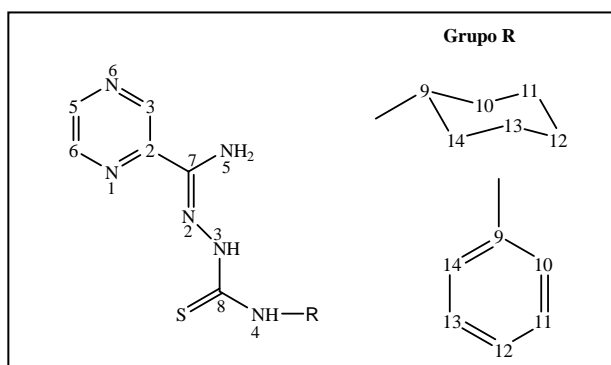


Fonte: CHAN et al., 2010

5.1.4 –Espectros de ressonância magnética nuclear

Os complexos de gálio(III) foram caracterizados por RMN de 1H , ^{13}C , DEPT, COSY e HMQC, utilizando-se $DMSO-d_6$ como solvente. A numeração utilizada para a atribuição de hidrogênios e carbonos das tiossemicarbazonas é apresentada na Figura 41.

Figura 41– Esquema de numeração para os espectros de ressonância magnética nuclear de 1H .



Fonte: O autor, 2016.

Para os complexos de gálio(III) verificam-se variações similares nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , quando comparados com seus respectivos ligantes. Nos espectros de RMN ^1H dos complexos (Tabela 16), verifica-se o desaparecimento do sinal referente ao N(3)-H, indicando que as tiossemicarbazonas encontram-se coordenadas ao metal na sua forma desprotonada, conforme podemos ver no exemplo 42 para $[\text{Ga}(\text{PzAm4E})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A ausência de sinais duplicados para os hidrogênios dos complexos também revela que as duas moléculas de ligante coordenadas ao gálio são equivalentes.

O sinal correspondente aos hidrogênios N(5)H₂ dos complexos sintetizados são equivalentes. Nos complexos, este sinal aparece em campo mais baixo em relação aos ligantes de partida, sugerindo complexação em N(2).

Os espectros de RMN de ^{13}C dos complexos (7-10) indicam que com a coordenação, a maioria dos sinais de carbono da pirazina, assim como C(7) e C(8) sofrem deslocamentos significativos com relação às suas posições nas tiossemicarbazonas livres (Tabela 17). Isto sugere o envolvimento dos nitrogênios pirazínico e imínico e do enxofre na coordenação ao centro metálico, pelo sistema N_{pz}-N-S, indicando que as tiossemicarbazonas adotam a configuração *E* quando coordenadas. Esta característica foi observada para todos os complexos

No que diz respeito ao sinal de C=S, este aparece entre 174,09 e 177,09 ppm nos espectros de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas sintetizadas. Nos complexos de gálio(III) há um deslocamento deste sinal para campo mais alto (164,23–168,34 ppm). Esta blindagem do sinal no complexo pode ser devido à coordenação como tiolato, com enfraquecimento da ligação C=S pela coordenação ao metal (Riobó, 2007). A Figura 43 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C do ligante (3) e do complexo (8).

Tabela 16– Atribuição (A), número de hidrogênios (N°), deslocamento químico (δ), multiplicidade^a, J (Hz) dos sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas **1–5** de seus complexos de gálio(III) (**6–10**)

A	N°	δ (ppm)									
		HPzAm4DH (1)	(6)	HPzAm4M (2)	(7)	HPzAm4E (3)	(8)	HPzAm4Cex (4)	(9)	HPzAm4Ph (5)	(10)
N(5)H	2	6,94 (s)	8,27(s)	6,92 (s)	8,29(s)	6,94 (s)	8,28(s)	6,97(s)	8,19(s)	7,14(s)	8,45(s)
N(4)H _a	1	8,01 (s)	6,80(s)	8,43 (q)	7,22(q)	8,49 (t)	7,23(t)	7,95(d)	7,09(d)	10,01(s)	9,42(s)
				J= 4,4	J=4,4	J= 6,0	J=5,9	J= 8,7	J= 8,6		
N(4)H _b	1	7,97 (s)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N(3)H	1	10,15 (s)	-	10,17 (s)	-	10,09 (s)	-	10,06(s)	-	10,52 (s)	-
C(3)H	1	9,67 (s)	9,66(m)	9,71 (d)	9,68 (s)	9,70(d)	9,67(s)	9,65(d)	9,67(s)	9,85 (d)	9,83(d)
				J= 1,8		J= 1,8		J= 1,4		J= 1,4	J=1,0
C(5)H	1	8,58 (s)	7,86(dd)	8,59 (dd)	7,84(m)	8,59(dd)	7,83(m)	8,61(m)	7,82(m)	8,62 (m)	8,02(m)
			J= 1,8; 2,7	J= 1,8; 2,7		J= 1,8; 2,7					
C(6)H	1	8,65 (d)	8,99(d)	8,65 (d)	8,97(d)	8,66(d)	8,98(d)	8,68(d)	8,99(d)	8,69 (d)	9,04(d)
		J= 2,3	J= 2,3	J= 2,7	J=2,7	J= 2,7	J=2,7	J= 2,3	J=2,6	J= 2,3	J=2,9
CH ₃	3			3,02 (d)	2,93 (d)	1,14(t)	1,14(t)				
				J= 4,5	J=4,9	J= 7,1	J=7,1				
CH ₂	2					3,60(m)	3,48(m)				
C(9)H	1							4,22(m)	4,14(m)		
C(10)H _a	1							1,48(q)		7,58 (m)	7,82(d)
								J= 12,1; 3,32			J=7,3
C(10)H _e	1							1,85(d)			
								J= 9,7			
C(11)H _a	1							1,28(m)		7,36 (m)	7,00(t)
											J= 7,3
C(11)H _e	1							1,74(d)			
								J= 13,3			
C(12)H _a	1							1,14(m)		7,19 (m)	7,33(m)
C(12)H _e	1							1,16(d)			
								J= 12,9			
C(13)H _a	1							1,28(m)			

C(13)He	1						1,74(d)		
							<i>J</i> = 13,3		
C(14)Ha	1						1,48(q)		
							<i>J</i> = 12,1; 3,32		
C(14)He	1						1,85(d)		
							<i>J</i> = 9,7		

^aMultiplicidade: s = simpleto; d = duplete; dd= duplo duplete; t = tripleto; q = quadrupeleto; m = multipleto

Figura 42– Espectros de RMN de ^1H de A) HPzAm4E (**3**) e B) $[\text{Ga}(\text{PzAm4E})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**8**) em DMSO-d_6 .

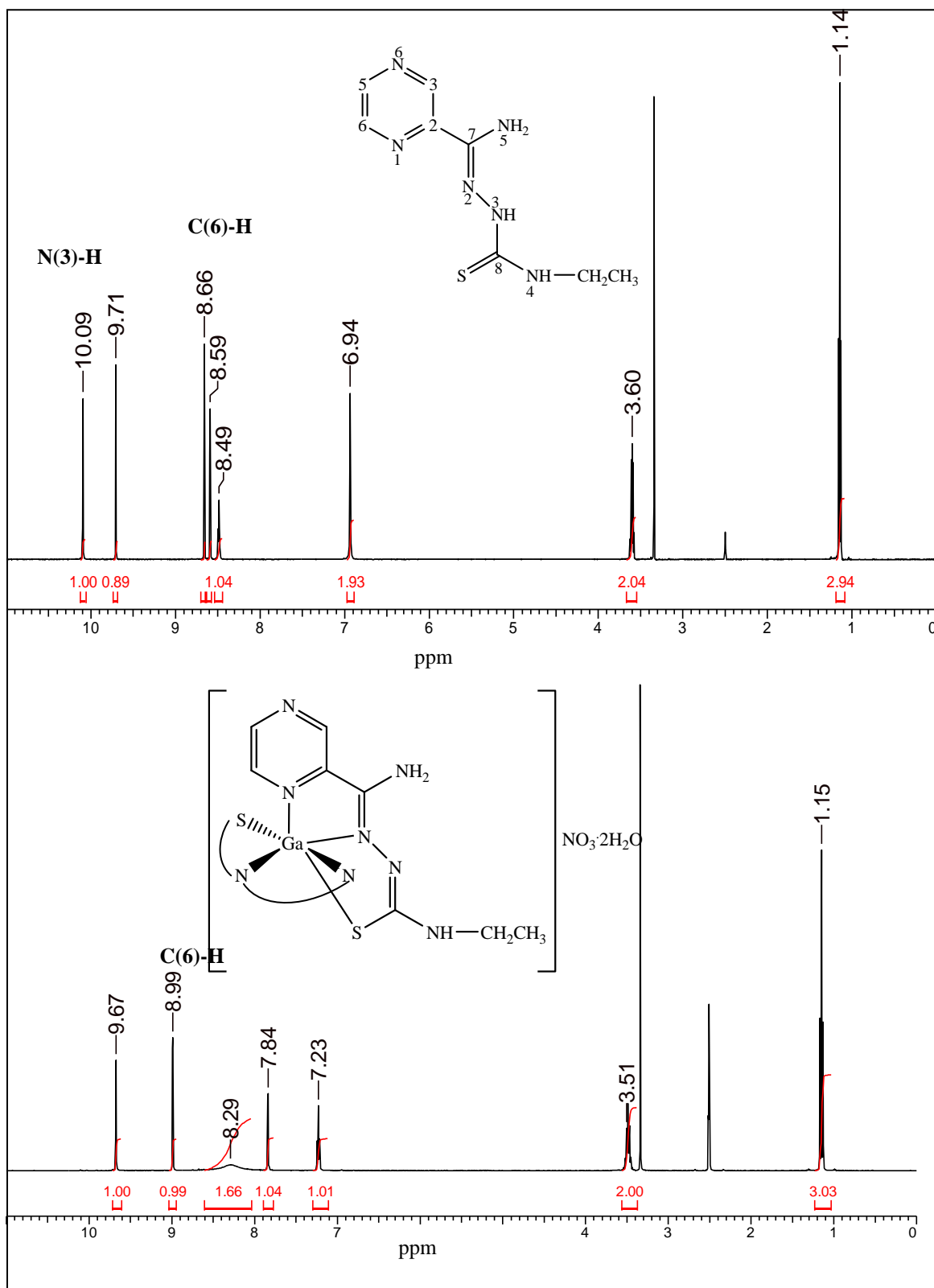
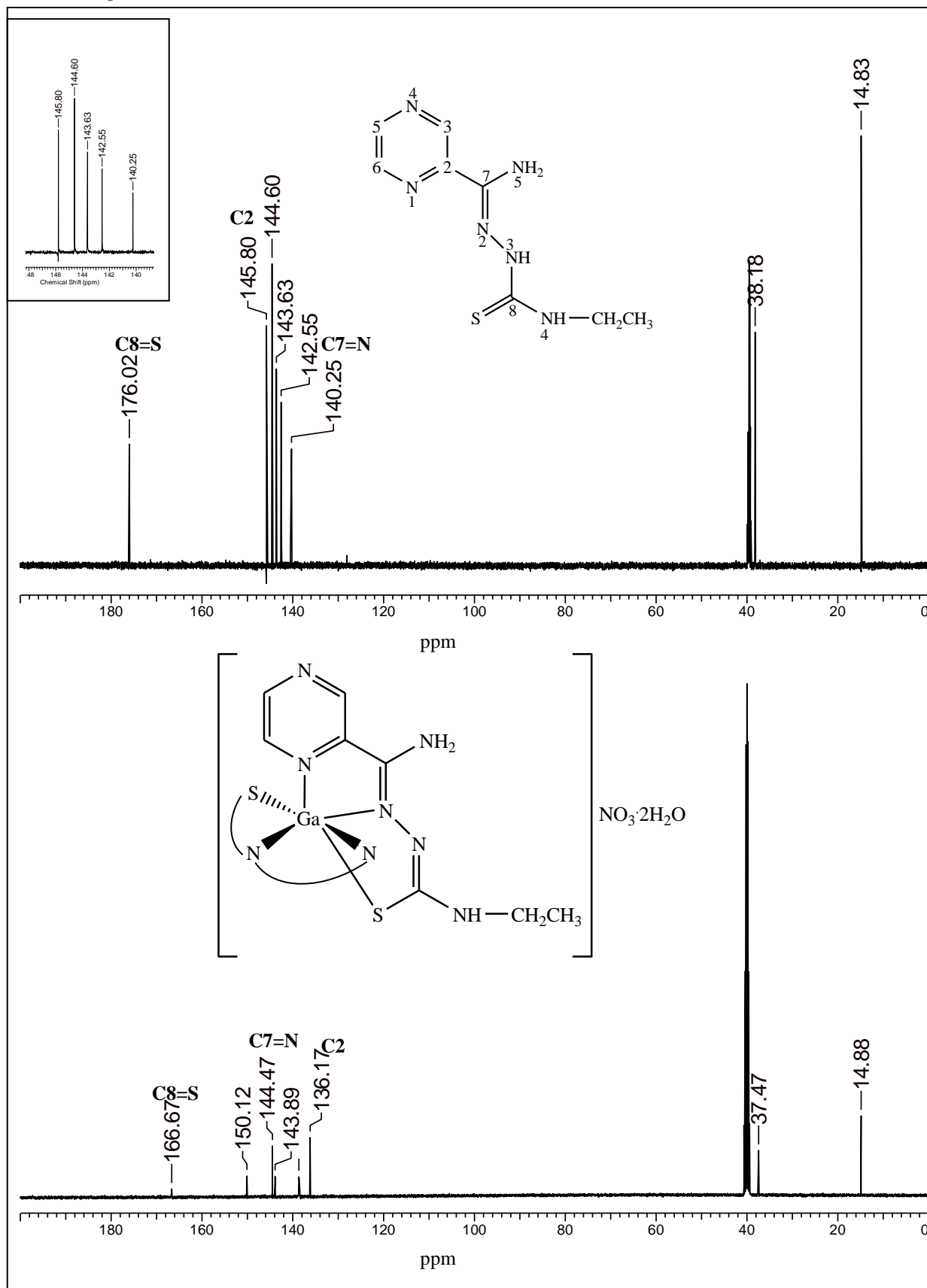


Tabela 17 – Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas (**1–5**) e dos complexos de gálio(III) (**6-10**)

A	δ (ppm)									
	(1)	(6)	(2)	(7)	(3)	(8)	(4)	(9)	(5)	(10)
C5	142,5	138,16	142,54	138,20	142,55	138,12	142,58	139,31	142,59	138,82
C3	143,7	143,50	143,63	143,40	143,63	143,39	143,48	144,67	143,96	144,58
C6	144,68	149,68	144,58	149,69	144,60	149,62	144,67	150,78	144,91	150,82
C7=N	140,46	144,36	140,19	144,11	140,25	144,47	140,50	144,92	141,11	144,58
C8=S	176,96	168,34	177,09	167,37	176,02	166,67	174,99	-	175,11	164,23
C2	145,77	135,61	145,82	135,64	145,80	136,17	145,68	137,02	145,54	135,88
CH ₂					38,18	37,47				
CH ₃			30,81	29,80	14,83	14,88				
C(9)							52,51	51,64	127,90	
C(10)/C(14)							31,82	33,79	126,01	
C(11)/C(13)							25,00	26,04	125,07	
C(12)							25,16	26,65	130,34	

Figura 43– Espectros de RMN de ^{13}C de A) HPzAm4E e B) $[\text{Ga}(\text{PzAm4E})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8) em $\text{DMSO}-d_6$



Para o produto **(6)** além dos sinais do ligante HPzAm4DH desprotonado, percebemos o aparecimento de três sinais no RMN de ^1H e seis sinais no RMN de ^{13}C , que sugerem a ciclização do ligante. Esse composto ciclizado não está ligado ao metal, uma vez que integrações para os hidrogênios mostram relação fracionada de complexo para composto ciclizado (Figuras 44, 45).

Figura 44–Espectro de RMN de ^1H de Produto **(6)** obtido em $\text{DMSO-}d_6$. Ampliação entre 6,0 e 10,0ppm.

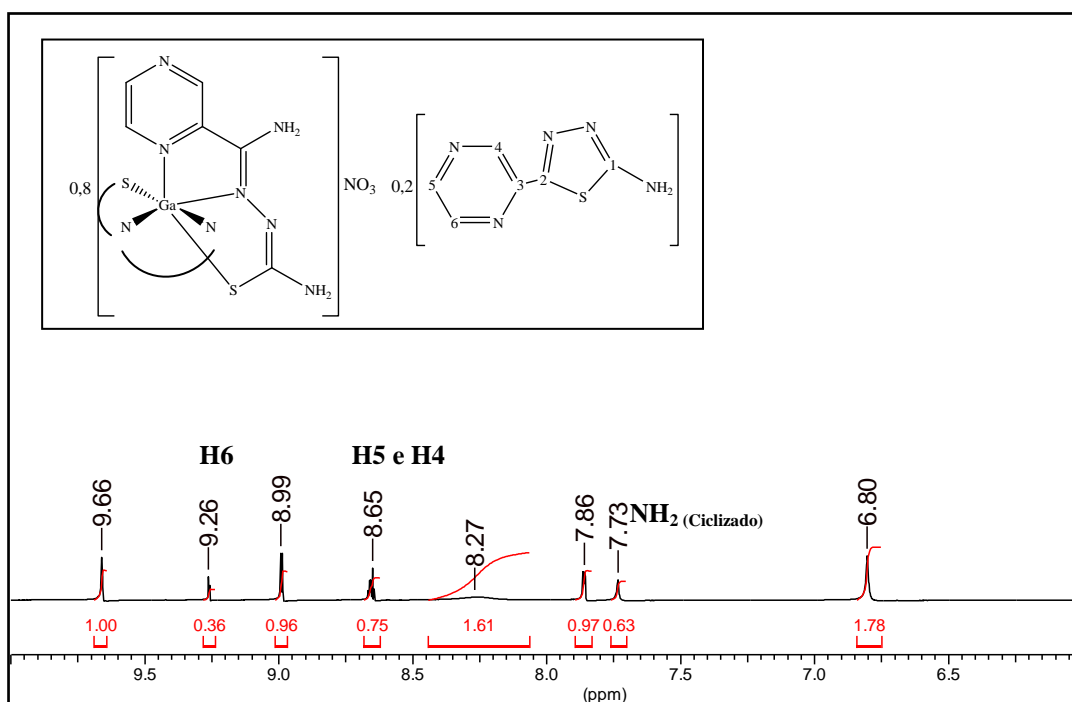
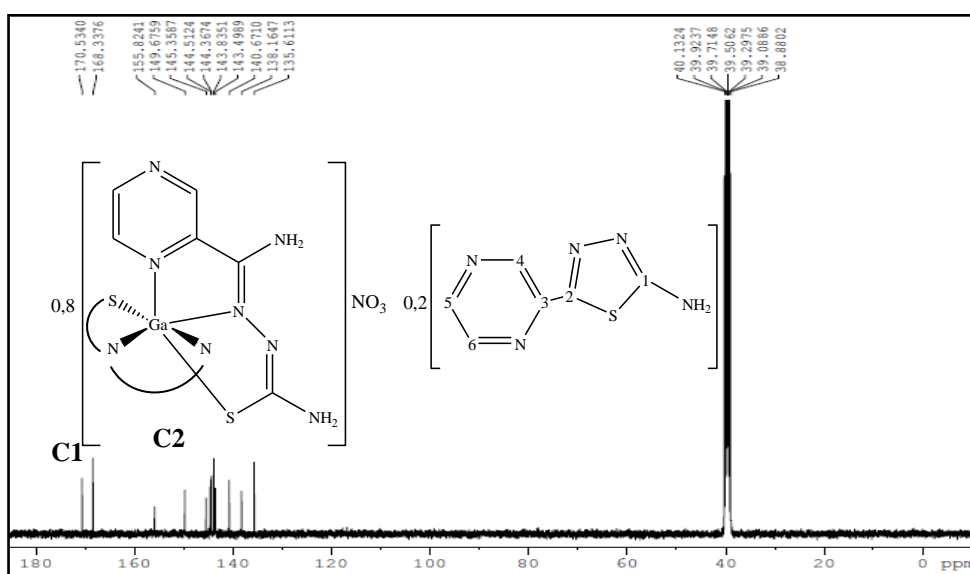
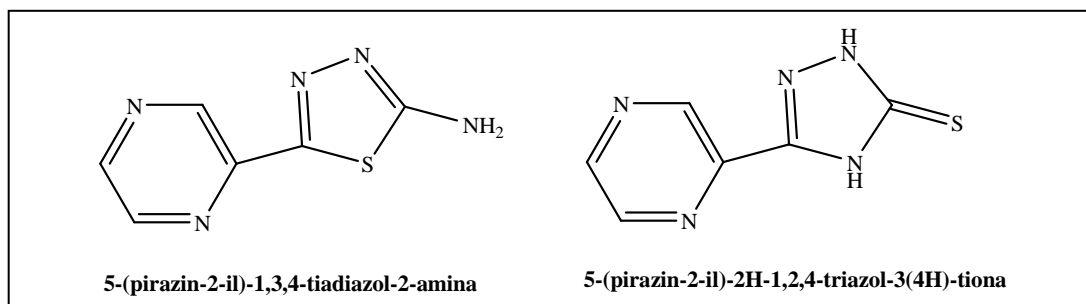


Figura 45–Espectro de RMN de ^{13}C do produto **(6)**



No caso de tiossemicarbazonas substituídas sobre o nitrogênio tioamida, a ciclização deste tipo de tiossemicarbazonas pode conduzir a formação de dois tipos de anéis heterocíclicos distintos para o ligante HPzAm4DH (**1**) (Figura 46).

Figura 46– Tipos de ciclização da tiossemicarbazona HPzAm4DH (**1**)

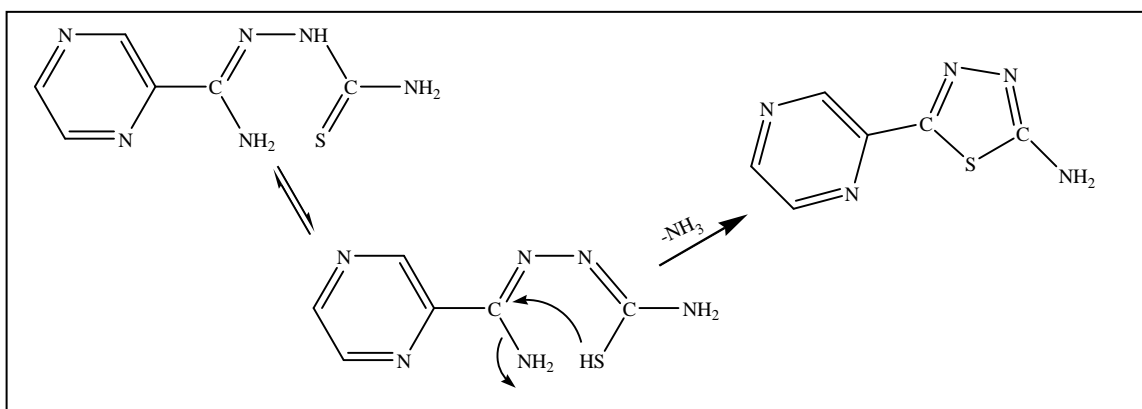


Fonte: RIOBÓ, 2007.

Para o produto (**6**) formado foi proposto através da análise de RMN, que a ciclização ocorreu entre o enxofre e o carbono imínico, devido a presença do grupo NH_2 no espectro de ^1H .

Para este mecanismo de ciclização é proposto que, a partir da forma tiol da tiossemicarbazona, um ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio da amina (N5) sobre o átomo de hidrogênio do grupo tiol, com ruptura heterolítica da ligação carbono-nitrogênio da amida, seguido do ataque nucleofílico intramolecular do enxofre no átomo de carbono C7 , gerando assim o ciclo (Riobó, 2007) (Figura 47).

Figura 47– Reação de ciclização do ligante HPzAm4DH



Fonte: O autor, 2016.

Após várias tentativas de purificação e de síntese utilizando outros solventes (etanol e acetona) não foi possível obter este produto puro. Devido a este fato, não foi possível realizar estudo biológico.

5.1.5 –Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma importante ferramenta para caracterização estrutural e dessa forma foi utilizada como uma das técnicas de caracterização dos compostos sintetizados neste trabalho.

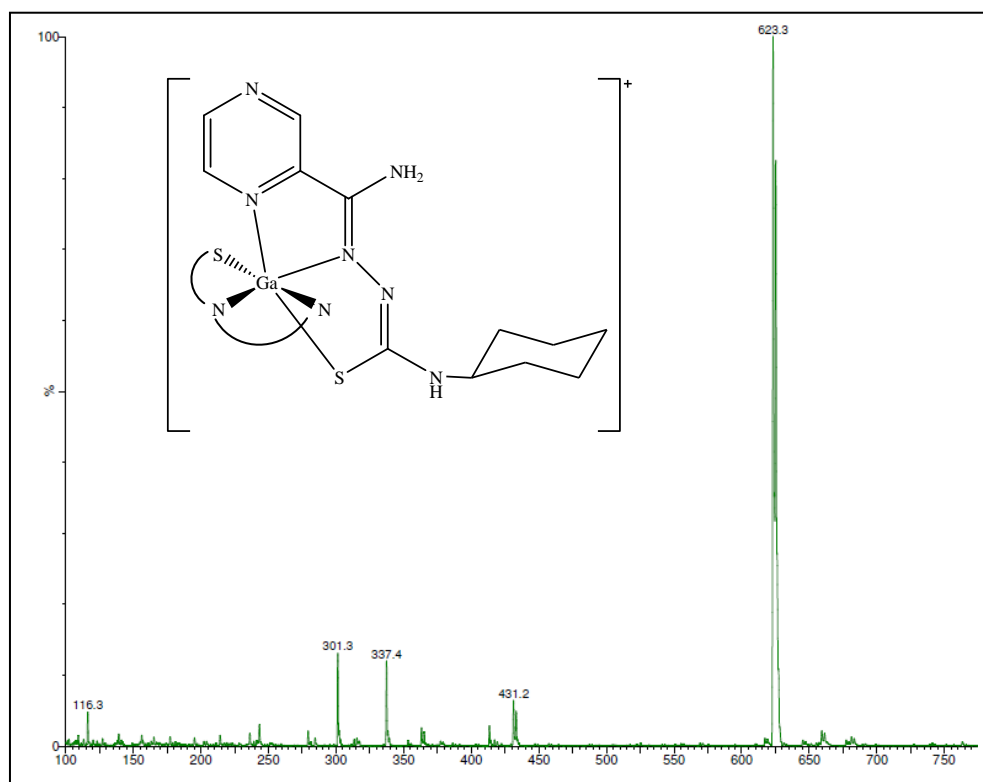
Na Tabela 18 são apresentados os dados de ESI-MS para os complexos de gálio(III). Todos os compostos foram dissolvidos em metanol. Os espectros foram adquiridos no modo positivo.

Tabela 18– Sinal mais significativo dos espectros de massas para os complexos de gálio(III)

Composto	m/z / abundância relativa (atribuição)
Produto(6)	459,0 (83%) [C ₁₂ H ₁₄ GaN ₁₂ S] ⁺
[Ga(PzAm4M) ₂]NO ₃ (7) (C ₁₄ H ₁₈ GaN ₁₂ S ₂) NO ₃	489,2 (100%) [C ₁₄ H ₁₈ GaN ₁₂ S ₂] ⁺
[Ga(PzAm4E) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (8) (C ₁₆ H ₂₂ GaN ₁₂ S ₂) NO ₃ ·2H ₂ O	515,2 (100%) [C ₁₆ H ₂₂ GaN ₁₂ S ₂] ⁺
[Ga(PzAm4Cex) ₂]NO ₃ ·3H ₂ O (9) (C ₂₄ H ₃₄ GaN ₁₂ S ₂) NO ₃ ·3H ₂ O	623,3(100%) [C ₂₄ H ₃₄ GaN ₁₂ S ₂] ⁺
[Ga(PzAm4Ph) ₂]NO ₃ ·H ₂ O (10) (C ₂₄ H ₂₂ GaN ₁₂ S ₂) NO ₃	610,9(100%) [C ₂₄ H ₂₂ GaN ₁₂ S ₂] ⁺

Nos espectros de massas foi possível determinar o pico do íon molecular [Ga(L)₂]⁺ como o mais abundante para todos os complexos de gálio(III). Através do espectro de massas do composto (6) foi confirmada ainda a presença da tiossemicarbazona ciclizada não coordenada ao metal, em m/z 179,5 (C₆H₅N₅S⁺) (ver no Apêndice D). Na Figura 48 temos o exemplo do espectro de massas do composto [Ga(PzAm4Cex)Cl₂]NO₃·3H₂O (9).

Figura 48– Espectro ESI–MS de $[Ga(PzAm4Cex)Cl_2]NO_3 \cdot 3H_2O$ (**9**), obtido no modo positivo



5.2–Atividade biológica

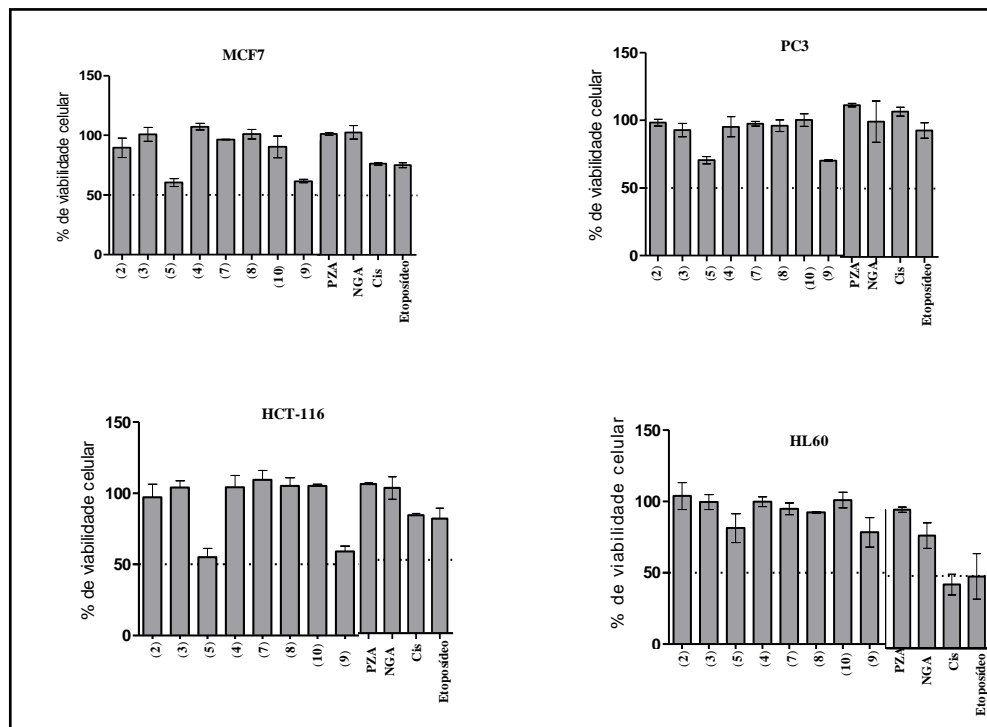
No presente trabalho foi investigada a ação citotóxica e antituberculose dos complexos de gálio(III) e tiossemicarbazonas. Para o composto (**6**) não foi realizado teste biológico por apresentar um composto ciclizado em sua composição.

5.2.1–Atividade citotóxica

As tiossemicarbazonas derivadas de 2-pirazinoformamida e seus complexos de gálio(III) foram testados quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais HL–60 (leucemia), HCT–116 (câncer cólon humano), MCF7 (adenocarcinoma de mama) e PC3 (câncer de próstata).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 3.4.1. Os resultados, expressos em porcentagem de viabilidade celular na concentração de 10 μ M, são apresentados na Figura 49, em comparação com os dados para as tiossemicarbazonas livres e para o sal $Ga(NO_3)_3$ e pirazinamida. Cisplatina (Cis) e etoposídeo, fármacos de referência, foram usados como controles positivos.

Figura 49– Porcentagem de viabilidade celular das tiossemicarbazonas, seus complexos (7-10), pirazinamida (PZA), nitrato de gálio (NGA) contra linhagens de células MCF7, PC3, HCT-116, HL-60.



De acordo com a Figura 49, em geral, as tiossemicarbazonas e seus complexos de gálio(III) (7-10) não demonstraram efeitos citotóxicos significativos contra as linhagens de células tumorais, com exceção dos compostos (5) e (9), os quais foram mais citotóxicos às linhagens MCF7, PC3 e HCT-116 quando comparados com a cisplatina e etoposídeo. Os compostos ainda foram tão ativos quanto os fármacos de referência contra a linhagem HL-60, a qual parece ser a linhagem mais sensível a 5 e 9.

A concentração dos compostos que inibe em 50% o crescimento das células tumorais (CI_{50}) foi determinada para os compostos (5) e (9) para as linhagens de células tumorais MCF-7, HCT-116, HL-60. Com o intuito de avaliar a toxicidade dos compostos sobre células normais, também foi determinado seu valor de CI_{50} contra células VERO (rim de macaco). Os valores de CI_{50} para os compostos contra células tumorais e sadias (não-tumorais) encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 – Efeito citotóxico (CI₅₀) (μM) contra células MCF-7, HCT-116 e HL-60 e VERO da tiossemicarbazona (5) e o complexo de gálio(III) (9)

Compostos	MCF-7		HCT-116		HL-60		VERO
	CI ₅₀	IS	CI ₅₀	IS	CI ₅₀	IS	CI ₅₀
(5)	>50	ND	>50	ND	>50	ND	>50
(9)	>50	ND	7,4±3,3	6,7	14,1±9,3	9,8	>50
Etoposídeo	>100	ND	>100	ND	0,7	71	>100

Legenda: ND = não determinado para concentrações IC₅₀ maior que 50 μM, IS = índice de seletividade estimado nas linhagens tumorais em relação a linhagem não tumoral VERO

De acordo com a Tabela 19, foi observado que o composto (5) foi menos ativo do que o composto de referencia nas células tumorais testadas. O composto (9) apresentou melhor atividade que o fármaco etoposídeo contra células HCT-116, sendo ainda cerca de seis vezes menos tóxico às células VERO. Para a linhagem de células HL-60 apresentou boa atividade, sendo porém menos ativo que etoposídeo. Todos os compostos apresentaram igual ou baixa toxicidade às células VERO.

5.2.2 – Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*

Foram testadas as atividades antimicrobianas das tiossemicarbazonas e seus complexos de gálio(III) com o objetivo de avaliar o efeito da coordenação sobre a ação antimicrobiana de tiossemicarbazonas. Os resultados obtidos estão na Tabela 21. Os valores de CIM determinados para os compostos estão listados na Tabela 23, juntamente com o nitrato de gálio e pirazinamida (PZA), fármaco de referência.

Assim, a indicação “Sen” representa que as bactérias foram sensíveis aos compostos, de modo que houve sua interferência no crescimento ou na viabilidade bacteriana. E a indicação “Res” indica que as bactérias foram resistentes aos compostos estudados, ou seja, esses não interferiram em seu crescimento ou viabilidade. Para cada composto, a menor concentração na Tabela 20 com a indicação “Sen” corresponde à CIM, a qual está apresentada na Tabela 21 em unidade de concentração molar.

Tabela 20– Avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos de gálio(III) em comparação com as tiossemicarbazonas livres, nitrato de gálio e pirazinamida (PZA)

Composto	100	50	25	12,5	6,25	3,12
	µg / mL	µg / mL	µg / mL	µg / mL	µg / mL	µg / mL
HPzAm4M (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Ga(PzAm4M) ₂] ₂ NO ₃ (7)	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4E (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Ga(PzAm4E) ₂] ₂ NO ₃ .2H ₂ O (8)	Sen	Sen	Res	Res	Res	Res
HPzAm4Cex (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Ga(PzAm4Cex) ₂] ₂ NO ₃ .3H ₂ O (9)	Sen	Sen	Res	Res	Res	Res
HPzAm4Ph (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Ga(PzAm4Ph) ₂] ₂ NO ₃ .H ₂ O (10)	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
Ga(NO ₃) ₃ .H ₂ O	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
PZA	Res	Res	Res	Res	Res	Res

Sen- Sensível/**Res-** Resistente

Tabela 21–Atividade *in vitro*^a dos complexos 7-10, suas respectivas tiossemicarbazonas livres, do sal Ga(NO₃)₃ e do fármaco pirazinamida (PZA) contra *M. tuberculosis* H37Rv

Composto	CIM(µmol L ⁻¹)	Composto	CIM(µmol L ⁻¹)
HPzAm4M (2)	> 475,60	[Ga(PzAm4Cex) ₂] ₂ NO ₃ .3H ₂ O (9)	67,52
[Ga(PzAm4M) ₂] ₂ NO ₃ (7)	181,74	HPzAm4Ph (5)	>367,20
HPzAm4E (3)	> 445,85	[Ga(PzAm4Ph) ₂] ₂ NO ₃ .H ₂ O (10)	144,43
[Ga(PzAm4E) ₂] ₂ NO ₃ .2H ₂ O (8)	81,39	Ga(NO ₃) ₃ .H ₂ O	>390,95
HPzAm4Cex (4)	>359,22	PZA	> 812,28

Legenda:^a Atividade antimicrobiana expressa como Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Conforme apresentado anteriormente, as tiossemicarbazonas não são ativas contra as espécies *M. tuberculosis* nas concentrações estudadas e utilizando-se o método MABA. O sal do metal também não mostrou atividade. A baixa ou não atividade de sais de metais pode estar relacionada à sua limitação quanto à passagem para o meio intracelular, o que pode ser contornado por meio da coordenação a ligantes adequados.

Comparando-se os valores de CIM das tiossemicarbazonas livres com os valores obtidos para os complexos, pode-se observar que a atividade dos complexos é melhor que a das tiossemicarbazonas não coordenadas. Os complexos **(8)** (CIM= $81,39 \mu\text{mol L}^{-1}$) e **(9)** (CIM= $67,52 \mu\text{mol L}^{-1}$) mostraram-se mais ativos que os demais, confirmando que a coordenação ao Ga^{3+} melhorou a atividade biológica em relação a *Mycobacterium tuberculosis* e foram melhores que a pirazinamida.

Poucos relatos são verificados na literatura para compostos de gálio contendo tiossemicarbazonas com atividade antituberculose (Machado et al., 2014; Chitambar, 2016). Assim, este estudo inicial com estes compostos vem a contribuir para uma posterior avaliação de outras atividades como antileishmaniose, antifúngica e investigar a relação entre estrutura e atividade com o intuito de se produzir fármacos mais ativos e menos tóxicos.

6–COMPLEXOS DE BISMUTO(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 2-PIRAZINOFORMAMIDA

Neste capítulo serão apresentadas as caracterizações e resultados de estudos biológicos realizados para complexos de bismuto(III) sintetizados com 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona (**1**) e seus derivados *N*⁴-metil-, etil-, cicloexil- efenil- (**2–5**). Os complexos foram analisados por ponto de decomposição, análise elementar, medidas de condutividade molar (Tabela 22), espectroscopias no infravermelho e eletrônica, ressonância magnética nuclear de ¹H e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI–MS).

6.1– Caracterização dos complexos de bismuto(III)

6.1.1 –Características gerais, microanálises e condutividade molar

Os dados de análises elementares fornecem uma indicação de suas fórmulas moleculares que por sua vez são condizentes com as estruturas propostas. Os dados de condutividade molar em metanol abaixo de $80 \text{ ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ sugerem que os compostos de bismuto(III) são não-eletrólitos. Assim, de acordo com análise elementar e condutivimetria, os compostos apresentam a fórmula geral $[\text{Bi}^{3+}(\text{L}^-)\text{Cl}_2]$, sendo L^- correspondente à tiossemicarbazona desprotonada. Dessa forma, foi proposto que o íon metálico está coordenado a um tiossemicarbazonato e a dois ligantes cloro.

Tabela 22 – Rendimento (R), ponto de decomposição^a, massa molar (MM), análise elementar^b(C, H e N) e condutividade molar^c (em metanol) dos complexos de bismuto(III)

Composto	R (%)	P.D (°C)	MM (g mol ⁻¹)	%C	%H	%N	ΔM
[Bi(PzAm4DH)Cl ₂] (11)	90	235,2–237,1 (271,1–272,5)	475,11	14,73 (15,17)	1,56 (1,49)	17,20 (17,69)	16,15
[Bi(PzAm4M)Cl ₂] (12)	70	255,5–255,7 (200,4–202,8)	489,14	17,19 (17,19)	1,85 (1,85)	16,86 (17,18)	6,11
[Bi(PzAm4E)Cl ₂] (13)	67	266,1–267,1 (186,0–186,1)	503,16	18,85 (19,10)	2,17 (2,20)	16,56 (16,70)	8,33
[Bi(PzAm4Cex)Cl ₂].3H ₂ O (14)	71	225,8–226,8 (206,0–206,3)	611,30	23,93 (23,58)	3,20 (3,79)	13,57 (13,75)	10,09
[Bi(PzAm4Ph)Cl ₂] (15)	50	259,0–259,4 (196,4–200,3)	551,20	26,26 (26,15)	2,10 (2,01)	15,30 (15,25)	6,97

Legenda:^aPontos de fusão das tiossemicarbazonas livres encontram-se entre parênteses;^bValores teóricos entre parênteses; ^cValorem em Ohm⁻¹.cm².mol⁻¹

Nesta seção serão discutidos ainda os dados obtidos pelas espectroscopias no infravermelho e eletrônica, RMN e espectrometria de massas (ESI-MS) com o objetivo de elucidar as estruturas dos complexos sintetizados neste trabalho.

6.1.2 –Espectroscopia no Infravermelho

As principais bandas nos espectros vibracionais no infravermelho dos compostos de bismuto(III) são reportadas na Tabela 23. As vibrações atribuídas a $\nu(\text{C}=\text{N})$ em 1508–1545 cm⁻¹ nos espectros das tiossemicarbazonas livres deslocam-se para 1539–1564 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, estando de acordo com a coordenação ao íon metálico pelo nitrogênio imínico (Rebolledo et al., 2005).

Tabela 23 – Principais bandas no IV (cm^{-1}) das tiossemicarbazonas e dos complexos de bismuto(III)

Complexos	$\nu\text{NH, NH}_2$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{CS})$	γCH ou β anel	$\rho(\text{pz})$
HPzAm4DH (1)	3439, 3341, 3289, 3157	1537	799	854	579
[Bi(PzAm4DH)Cl₂] (11)	3395, 3348, 3292, 3264	1541	748	858	584
HPzAm4M (2)	3458, 3349, 3308, 3134	1508	777	860	563
[Bi(PzAm4M)Cl₂] (12)	3389, 3289, 3225	1547	752	856	615
HPzAm4E (3)	3439, 3343, 3333, 3150	1537	777	856	571
[Bi(PzAm4E)Cl₂] (13)	3397, 3294	1539	752	856	619
HPzAm4Cex (4)	3443,3343, 3244, 3142	1539	785	858	592
[Bi(PzAm4Cex)Cl₂].3H₂O (14)	3381,3327, 3258, 3205	1564	746	850	639
HPzAm4Ph (5)	3414, 3309, 3275, 3225	1545	762	860	594
[Bi(PzAm4Ph)Cl₂] (15)	3410, 3321	1562	748	856	594

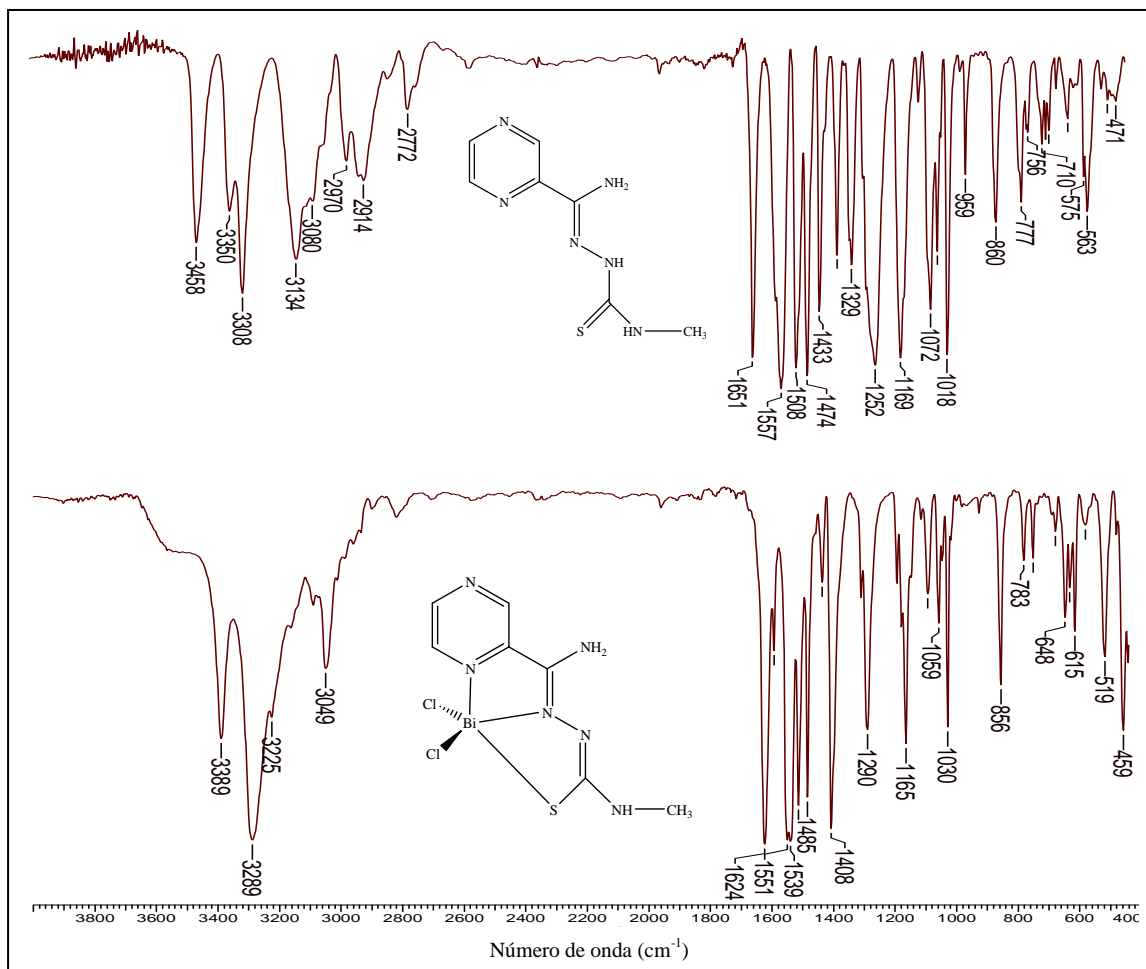
Legenda: ν =estiramento, γ = deformação fora do plano, β = deformação anel, ρ =deformação fora do plano

A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em $762\text{--}799\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das bases livres, desloca-se para $748\text{--}752\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação pelo enxofre. O deslocamento significativo está de acordo com a complexação do enxofre na forma de tiolato, ou seja, as tiossemicarbazonas encontram-se desprotonadas no N(3) nos complexos (Rebolledo et al., 2003).

A banda correspondente ao modo de deformação do anel pirazínico fora do plano $\rho(\text{pz})$ situada na região de $563\text{--}594\text{ cm}^{-1}$ das tiossemicarbazonas livres está situada a frequências maiores nos complexos metálicos, o que seria indicativo da coordenação do ligante ao metal através do nitrogênio pirazínico (Zhang et al., 2012).

Na Figura 50 são apresentados, como exemplo, os espectros no infravermelho da tiossemicarbazona HPzAm4M e de seu complexo [Bi(PzAm4M)Cl₂].

Figura 50–Espectros no IV da tiossemicarbazona HPzAm4M (a) e do complexo [Bi(PzAm4M)Cl₂] (b), respectivamente, obtidos em pastilha de KBr (4000-400cm⁻¹)



6.1.3 –Espectroscopia eletrônica

Para se confirmar a complexação e caracterizar os complexos sintetizados, realizou-se a leitura da absorção na região UV-Vis, em metanol grau espectroscópico, para cada composto e para as tiossemicarbazonas. Determinou-se o comprimento de onda de absorção máxima e calculou-se seu respectivo coeficiente de absorvidade molar (ϵ).

As posições das bandas mais relevantes dos espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas e dos compostos de bismuto(III) são reportadas na Tabela 24.

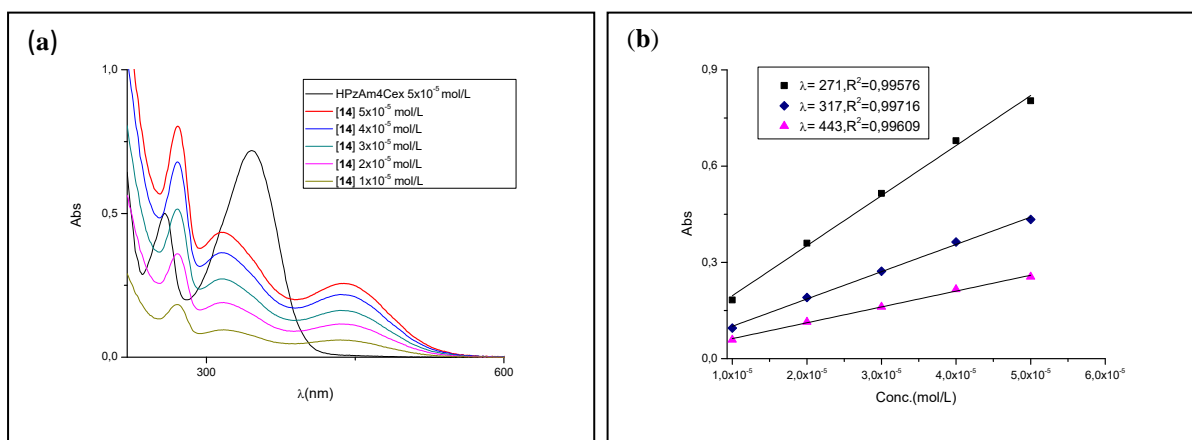
Tabela 24– Bandas^a observadas nos espectros eletrônicos em metanol das tiossemicarbazonas e complexos de bismuto(III) e seus respectivos valores de ϵ .

Complexos	Banda I	Banda II	Banda III
HPzAm4DH (1)	257(11401)	342(19120)	-
[Bi(PzAm4DH)Cl ₂] (11)	270(6547)	311(3843)	436(1813)
HPzAm4M (2)	257(12531)	345(18241)	-
[Bi(PzAm4M)Cl ₂] (12)	270(10118)	319(6575)	431(3750)
HPzAm4E (3)	257(10443)	345(15200)	-
[Bi(PzAm4E)Cl ₂] (13)	270(12524)	315(6985)	432(4219)
HPzAm4Cex (4)	258(13366)	346(16647)	-
[Bi(PzAm4Cex)Cl ₂].3H ₂ O (14)	271(15602)	317(8505)	443(4941)
HPzAm4Ph (5)	258(15983)	347(17447)	-
[Bi(PzAm4Ph)Cl ₂] (15)	271(21970)	321(8391)	426(6103)

Tiossemicarbazonas mostram dois máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletrônico. Um máximo de intensidade em 257 nm pode ser atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Esta absorção é característica de compostos que contêm tanto sistemas π , quanto pares de elétrons isolados, como é o caso de uma amida (Pavia et al., 2010). Esta banda no espectro eletrônico dos complexos de bismuto(III) com tiossemicarbazonas mostrou alterações, como podem ser vistos na Figura 50. Houve deslocamento dessa banda de absorção para cerca de 270 nm, para todos os complexos, para região de menor energia (efeito batocrômico).

A segunda banda com máximo de absorção entre 342 e 347 nm corresponde às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometino e tioamida das tiossemicarbazonas (West et al., 1997). Com a complexação, em todos os casos houve um deslocamento desta banda para região de maior energia (efeito hipsocrômico), que podemos visualizar na Figura 51(a e b) para HPzAm4Cex (**4**) e [Bi(PzAm4Cex)Cl₂].3H₂O (**14**).

Figura 51–Espectro eletrônico de HPzAm4Cex (4) e [Bi(PzAm4Cex)Cl₂].3H₂O (14) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ para (14)(b)



Nos complexos obtidos neste trabalho, foi possível observar bandas de transição de transferência de carga do ligante para o metal, na faixa de 426 e 443 nm (Saad et al., 2007). Estas bandas apresentaram intensidade alta, característica deste tipo de transição, com absorvidade molar entre 1813 e 6103 Lmol⁻¹cm⁻¹.

6.1.4 –Ressonância Magnética Nuclear

Em todos os espectros de RMN de ¹H das substâncias sintetizadas foram observados os sinais de hidrogênio consistentes com os grupos R utilizados. Todas as análises foram realizadas em metanol deuterado, devido a isso os sinais de NH não foram visualizados. Aminas são compostos que estão sujeitos a ligações de hidrogênio e na presença de solvente deuterado como metanol, seus hidrogênios são trocados deixando de ser visíveis num espectro de ¹H (Silverstein et al., 2005). Foi observado um sinal para cada tipo de hidrogênio, indicando que a presença de um único isômero, que não foi identificado devido à ausência de sinais de hidrogênio amínico. No entanto, espera-se que esse seja o isômero *E*, o qual foi o único observado em espectro de RMN obtido em outro solvente (DMSO-*d*₆).

Os deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições estão compilados na Tabela 25. Analisando-se o espectro de RMN ¹H do ligante HPzAm4DH (Figura 52) notam-se dois sinais em campo baixo referentes aos hidrogênios do anel pirazínico: um duplete em 9,47 ppm atribuído ao hidrogênio ligado a C(3) e um multiplete ocorrendo em 8,59 ppm, atribuído a C(5)H e C(6)H.

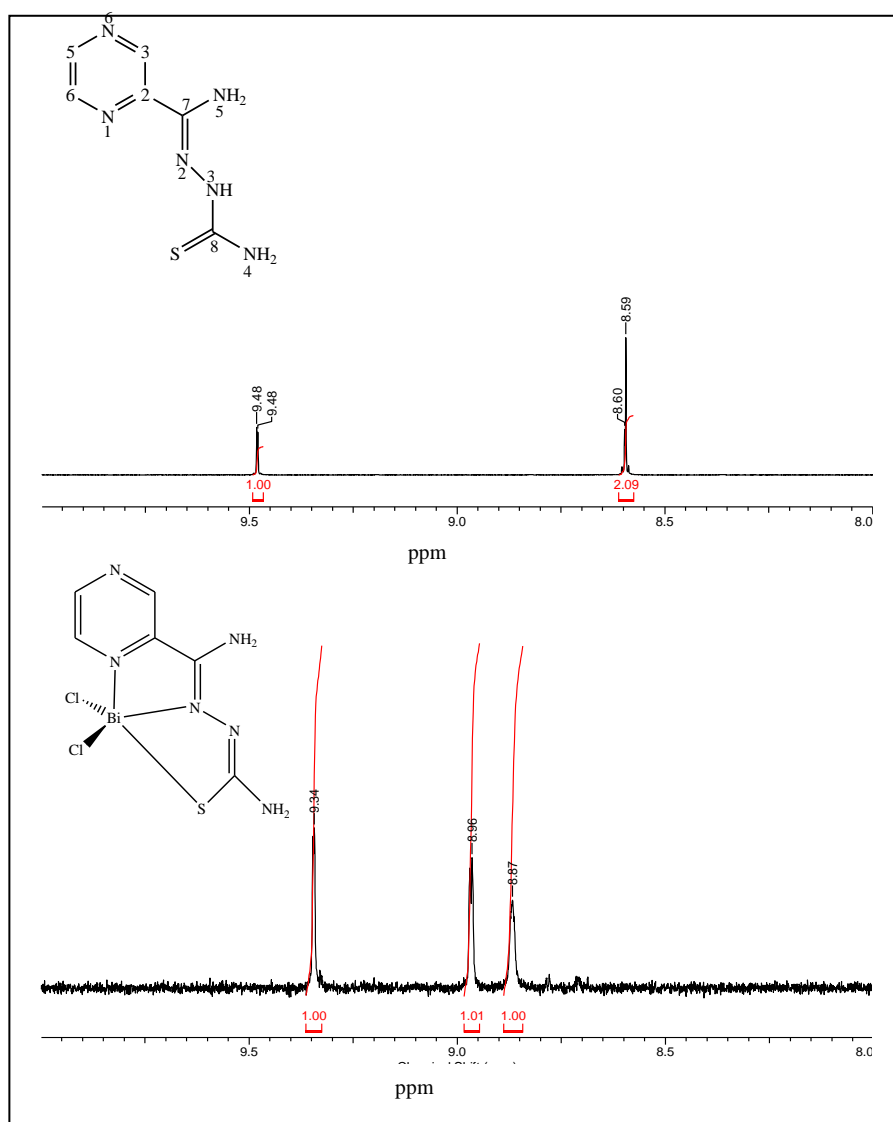
Tabela 25– Atribuição (A), número de hidrogênios (N^o), deslocamento químico (δ), multiplicidade¹, J (Hz) dos sinais de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas **1–5** edos complexos de bismuto(III) **11–15**, obtidos à partir de seus espectros em metanol deuterado.

A	N ^o	δ (ppm)									
		(1)	(11)	(2)	(12)	(3)	(13)	(4)	(14)	(5)	(15)
C(3)H	1	9,47 (d) J= 1,2	9,32 (d) J= 1,6	9,53 (d) J= 1,3	9,30(m)	9,51(d) J= 1,2	9,30(m)	9,42(m)	9,45(m)	9,59(d) J= 1,5	9,36(d) J= 1,3
C(5)H	1	8,59 (m)	8,96 (d) J= 2,4	8,58(m)	8,61(m)		8,85(m)	8,60(m)	8,91(m)	8,61 (m)	8,63 (m)
C(6)H	1		8,85 (s)		8,59(m)	8,59(m)	8,82(m)				
CH ₃	3			3,16 (s)	3,07(m)	1,25(t) J= 7,09	1,62(m)				
CH ₂	2					3,70(q) J= 7,09	3,17(m)				
C(9)H	1							4,09(m)	4,29(m)		
C(10)Ha								1,39(m)	1,43(m)	7,64(m)	7,61(d) J=7,7
C(10)He	1							2,05(d) J=9,8	2,03(m)		
C(11)Ha	1							1,3(m)	1,29(m)	7,39(m)	7,38(t) J=7,9
C(11)He	1							1,8(m)	1,79(m)		
C(12)H	1							1,23(d) J=11,7	1,28(m)	7,09(t) J=7,3	7,1(t) J=7,1
C(12)Ha	1							1,23(d) J=11,7	1,28(m)		
C(13)He	1							1,3(m)	1,29(m)		
C(13)Ha	1							1,8(m)	1,79(m)		
C(14)He	1							1,39(m)	1,43(m)		
C(14)H	1							2,05(d) J=9,8	2,03(m)		

Legenda:¹Multiplicidade: s = simpleto; d = dupleto; t = tripleto; q = quadrupleto; m = multipleto

Os espectros de RMN de ^1H dos complexos são bem semelhantes e indicam a coordenação do ligante ao metal, devido ao deslocamento significativo dos sinais referentes ao anel da pirazinamida. Como exemplo, na Figura 52 no espectro do complexo $[\text{Bi}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (**11**) podemos visualizar que houve um deslocamento de C(3)H para região de campo mais alto, de 9,47 ppm para 9,32 ppm, em relação à tiossemicarbazona livre. No caso de C(5)H e C(6)H, seus sinais deslocaram-se para regiões de campo baixo, de 8,59 para 8,96 e 8,85 ppm, respectivamente.

Figura 52– Espectros ampliados (8 a 10 ppm) de RMN de ^1H em $\text{MeOD-}d_4$ de A) HPzAm4DH (**4**), e B) $[\text{Bi}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (**11**)



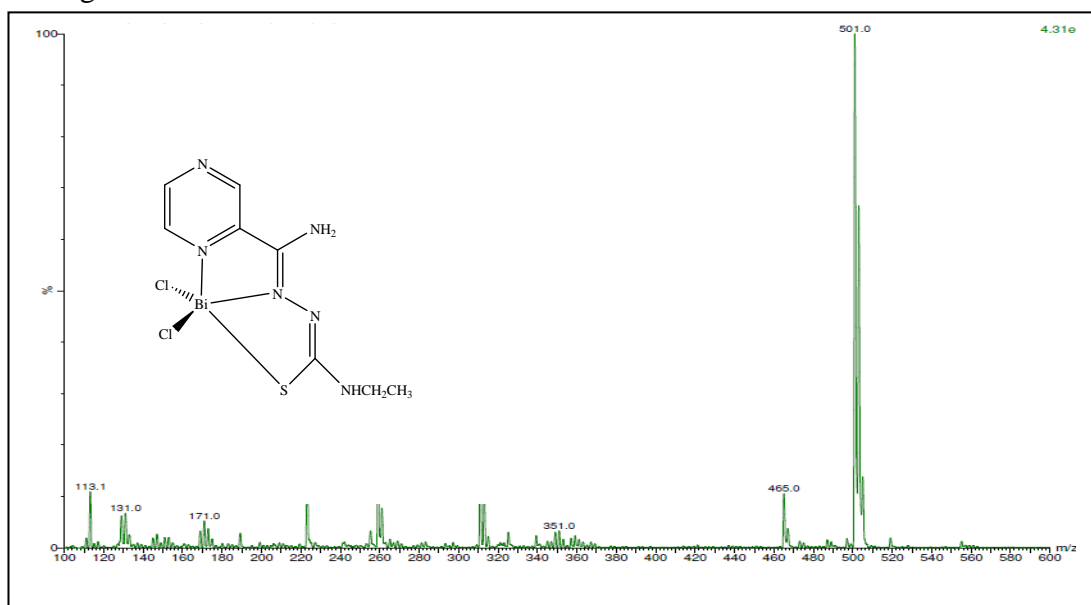
6.1.5 –Espectrometria de massas

Para os complexos de bismuto(III), as melhores condições de análise foram no modo negativo, em solução de metanol, uma vez que possibilitou a observação do pico a que se atribuiu ao íon molecular do complexo. A Tabela 26 apresenta os dados do íon molecular e dos picos observados por ESI–MS para os complexos de bismuto. Na Figura 53 observa-se o espectro de massas do $[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2](7)$, obtido em metanol no modo negativo.

Tabela 26– Sinais mais significativos dos espectros de massas (ESI-MS) para os complexos de bismuto(III) e suas respectivas atribuições

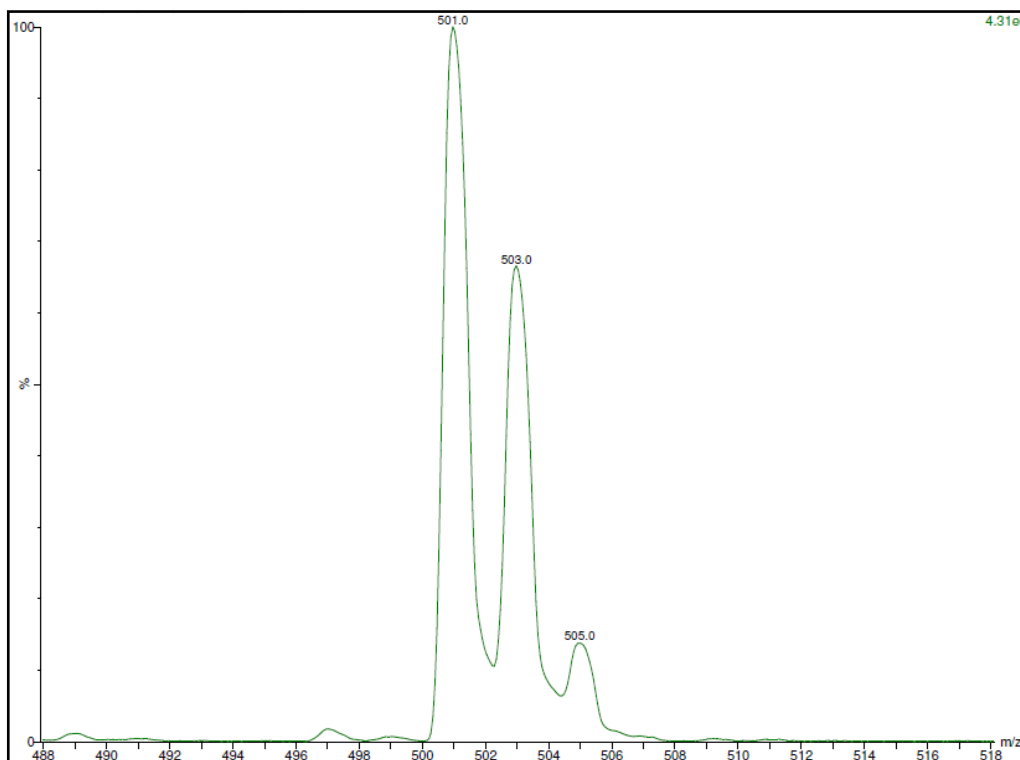
Composto	m/z (abundância relativa)		
	[atribuição]		
$[\text{Bi}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (11) ($\text{C}_6\text{H}_7\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	473,0 (100%) $[\text{C}_6\text{H}_6\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}]^-$	437,1 (4%) $[\text{C}_6\text{H}_5\text{BiClN}_6\text{S}]^-$	195,1 (5%) $[\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_6\text{S}]^-$
$[\text{Bi}(\text{PzAm4M})\text{Cl}_2]$ (12) ($\text{C}_7\text{H}_9\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	486,9 (100%) $[\text{C}_7\text{H}_8\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}]^-$	451,0 (15%) $[\text{C}_7\text{H}_6\text{BiClN}_6\text{S}]^-$	209,2 (18%) $[\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_6\text{S}]^-$
$[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$ (13) ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	501,0 (100%) $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}]^-$	465,0 (11%) $[\text{C}_7\text{H}_6\text{BiClN}_6\text{S}]^-$	223,2 (15%) $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_6\text{S}]^-$
$[\text{Bi}(\text{PzAm4Cex})\text{Cl}_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14) ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{SO}_3$)	555,1 (91%) $[\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}]^-$	519,2 (4%) $[\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{BiClN}_6\text{S}]^-$	254,1 (100%) $[\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{BiClN}_6\text{S}]^-$
$[\text{Bi}(\text{PzAm4Ph})\text{Cl}_2]$ (15) ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	549,1 (62%) $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{S}]^-$	393,5 (100%) $[\text{C}_6\text{H}_7\text{BiClN}_5]$	365,5 (93%) $[\text{C}_5\text{H}_5\text{BiClN}_4]$

Figura 53– Espectro de massas (ESI-MS) de $[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$ (**13**), obtido em metanol no modo negativo.



A Figura 54 mostra a distribuição isotópica para o íon molecular aniônico do complexo $[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]^-$ (13). Como pode ser observado nesta figura, o espectro obtido apresentou três picos de relações m/z iguais a 501, 503 e 505. Esta informação é coerente com a estrutura química do composto 13, que possui massa molar exata de 501,99 g/mol, Soma-se a esta informação o fato de que os três picos apresentam intensidades condizentes com a distribuição isotópica de substância que apresenta dois átomos de cloro em sua estrutura, visto que este elemento químico está presente na natureza com abundância de 76% para ^{35}Cl e 24% para o ^{37}Cl . O pico referente ao íon molecular encontrado, o qual é o mais abundante, sugere que, assim como proposto com base na condutivimetria, de fato os cloretos estão coordenados ao íon metálico e não atuando como contra-íons.

Figura 54– Perfil isotópico para íon $[\text{Bi}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]^-$.



6.2–Atividade biológica dos complexos de bismuto(III)

6.2.1 –Atividade citotóxica

Os complexos de bismuto(III) com tiossemicarbazonas foram testadas quanto à atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas HCT–116 (câncer de cólon), PC3 (câncer de próstata) e SF–295 (glioblastoma).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 3.3.5. Os resultados, expressos em porcentagem de inibição de crescimento, são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27– Avaliação da atividade citotóxica das tiossemicarbazonas e dos complexos de bismuto(III)

Composto	% de Inibição do Crescimento (média ± desvio padrão)		
	HCT–116	PC3 ^a	SF–295
HPzAm4DH (1)	37,05±4,49	–	17,67±0,22
[Bi(PzAm4DH)Cl ₂] (11)	19,01±11,23	17,13±8,59	24,74±2,54
HPzAm4M (2)	11,19±5,96	–	24,44±1,58
[Bi(PzAm4M)Cl ₂] (12)	15,38±8,64	15,87±4,13	22,16±0,77
HPzAm4E (3)	44,72±14,27	–	-7,64±42,77
[Bi(PzAm4E)Cl ₂](13)	29,15±8,64	20,44±1,90	24,83±0,77
HPzAm4Cex (4)	-10,30±8,25	–	39,10±0,49
[Bi(PzAm4Cex)Cl ₂] 3H ₂ O(14)	62,21±0,58	38,50±6,02	43,34±14,60
HPzAm4Ph (5)	15,36±6,77	–	29,02±1,15
[Bi(PzAm4Ph)Cl ₂](15)	25,40±1,96	15,63±6,24	17,41±3,01
BiCl ₃	6,81±1,30	-6,51±2,22	6,81±1,30
PZA	-0,03±1,06	-4,11±5,36	-0,03±1,06

Legenda:^aNão realizado com as tiossemicarbazonas

De acordo com a Tabela 27, em geral as tiossemicarbazonas e seus complexos (11-15) não apresentaram uma atividade significativa contra as linhagens de células tumorais testadas.

6.2.2 –Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*

Foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana das tiossemicarbazonas e de seus complexos de bismuto(III) (**11-15**) contra *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados obtidos estão na Tabela 28, os quais permitem determinar a concentração mínima dos compostos que inibem a proliferação bacteriana (CIM), com base no método empregado. Assim, a indicação “Sen” representa que as bactérias foram sensíveis aos compostos, de modo que houve sua interferência no crescimento ou na viabilidade bacteriana. E a indicação “Res” indica que as bactérias foram resistentes aos compostos estudados, ou seja, esses não interferiram em seu crescimento ou viabilidade. Para cada composto, a menor concentração na Tabela 28 com a indicação “Sen” corresponde à CIM, a qual está apresentada na Tabela 29 em unidade de concentração molar.

Tabela 28– Avaliação da atividade antimicobacteriana dos complexos de bismuto(III) em comparação com as tiossemicarbazonas livres, o sal BiCl₃ e pirazinamida (PZA)

Composto	100	50	25	12,5	6,25	3,12
	µg / mL	µg / mL	µg / mL	µg / mL	µg / mL	µg / mL
HPzAm4DH (1)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Bi(PzAm4DH)Cl ₂] (11)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4M (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Bi(PzAm4M)Cl ₂] (12)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4E (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Bi(PzAm4E)Cl ₂] (13)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4Cex (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Bi(PzAm4Cex)Cl ₂].3H ₂ O(14)	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4Ph (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Bi(PzAm4Ph)Cl ₂] (15)	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
BiCl ₃	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
PZA	Res	Res	Res	Res	Res	Res

Sen- Sensível/**Res-** Resistente

Tabela 29– Atividade *in vitro*^a dos complexos **11-15**, suas respectivas tiossemicarbazonas livres, do sal BiCl₃ e do fármaco pirazinamida (PZA) contra *M. tuberculosis* H37Rv suscetíveis a ambas rifampicina e isoniazida

Composto	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Composto	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
HPzAm4DH (1)	> 509,61	HPzAm4Cex (4)	>359,22
[Bi(PzAm4DH)Cl ₂] (11)	> 210,48	[Bi(PzAm4Cex)Cl ₂].3H ₂ O(14)	163,59
HPzAm4M (2)	> 475,60	HPzAm4Ph (5)	>367,20
[Bi(PzAm4M)Cl ₂] (12)	>204,44	[Bi(PzAm4Ph)Cl ₂] (15)	181,42
HPzAm4E (3)	>445,85	BiCl ₃	438,37
[Bi(PzAm4E)Cl ₂] (13)	>198,74	PZA	> 812,28

As tiossemicarbazonas e os complexos de bismuto(III) não são ativos ou apresentaram baixa atividade contra o microorganismo testado. Uma melhor, porém baixa atividade foi verificada para os complexos **14** e **15** (CIM 163,59 e 181,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente). Portanto, a coordenação ao Bi³⁺ não resultou em compostos candidatos a fármacos antituberculosos.

7–COMPLEXOS DE ANTIMÔNIO(III) COM TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 2-PIRAZINOFORMAMIDA

Neste capítulo serão apresentadas as caracterizações e resultados de estudos biológicos realizados para complexos de antimônio(III) sintetizados com 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona (**1**) e seus derivados *N*⁴-metil-, etil-, cicloexil- efenil- (**2–5**). Os complexos foram analisados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar (Tabela 30), espectroscopias no infravermelho e eletrônica, ressonância magnética nuclear de sólido e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS).

7.1–Caracterização dos complexos de antimônio(III)

7.1.1–Características gerais, microanálises e condutividade molar

Na seção 3.3.4 foram descritas as sínteses dos complexos de antimônio(III) com 2-pirazinoformamida tiossemicarbazona (**1**) e seus derivados *N*⁴-metil-, -etil-, -cicloexil-, -fenil-, (**2–5**). Para os demais compostos, os dados de microanálises estão apresentados na Tabela 31. Os dados de análises elementares fornecem uma indicação de suas fórmulas moleculares que por sua vez são condizentes com as estruturas propostas. Os dados de condutividade elétrica molar em dimetilformamida abaixo de $65\text{ohm}^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ confirmam que os compostos de antimônio(III) são neutros. Assim, de acordo com análise elementar e condutivimetria, os compostos apresentam a fórmula geral $[\text{Sb}^{3+}(\text{L}^-)\text{Cl}_2]$, sendo L^- correspondente à tiossemicarbazona desprotonada. Dessa forma, foi proposto que o íon metálico está coordenado a um tiossemicarbazonato e a dois ligantes cloro.

Tabela 30–Rendimento (R), ponto de fusão, massa molar (MM), análise elementar (C, H e N)^a e condutividade molar (DMF, 1×10^{-3} mol L⁻¹) dos complexos de antimônio(III)

Composto	R (%)	P.F (°C)	MM (gmol ⁻¹)	%C	%H	%N	Λ_M
[Sb(PzAm4DH)Cl ₂] (16)	55	249,4–250,4 (271,1–272,5)	387,89	18,51 (18,58)	1,75 (1,82)	21,22 (21,67)	37,81
[Sb(PzAm4M)Cl ₂] (17)	79	236,9–237,3 (200,4–202,8)	401,92	21,95 (21,92)	2,33 (2,26)	21,28 (20,91)	17,18
[Sb(PzAm4E)Cl ₂] (18)	59	236,0–236,4 (186,0–186,1)	415,94	23,05 (23,10)	2,81 (2,67)	20,08 (20,20)	15,89
[Sb(PzAm4Cex)Cl ₂] (19)	66	215,5–216,6 (206,0–206,3)	470,03	31,00 (30,66)	3,62 (3,65)	17,83 (17,88)	19,69
[Sb(PzAm4Ph)Cl ₂] (20)	52	230,2–230,4 (196,4–200,3)	463,99	31,15 (31,06)	2,61 (2,39)	17,87 (18,11)	17,69

Legenda:^aPontos de fusão das tiossemicarbazonas livres encontram-se entre parênteses;^bValores teóricos entre parênteses; ^cValorem em Ohm⁻¹.cm².mol⁻¹

Nesta seção serão discutidos ainda os dados obtidos pelas espectroscopias no infravermelho, RMN de sólido e espectrometria de massas com o objetivo de elucidar as estruturas dos complexos sintetizados neste trabalho.

7.1.2 –Espectroscopia no Infravermelho

As principais bandas nos espectros no IV dos compostos de antimônio(III) são reportadas na Tabela 31. As vibrações atribuídas a $\nu(\text{C}=\text{N})$ em 1508–1545 cm⁻¹ nos espectros no IV das tiossemicarbazonas livres deslocam-se para 1529–1545cm⁻¹ nos espectros dos complexos, estando de acordo com a coordenação ao íon metálico pelo nitrogênio imínico (Lessa et al., 2011).

Tabela 31– Principais bandas no IV (cm^{-1}) dos complexos de antimônio(III) **16–20**, em comparação com as tiossemicarbazonas **1–5**

Complexos	ν NH, NH_2	ν (CN)	ν (CS)	γ CH ou β anel	ρ (pz)
HPzAm4DH (1)	3439, 3341, 3289, 3157	1537	799	854	579
[Sb(PzAm4DH)Cl₂] (16)	3466, 3375, 3246, 3130	1547	741	854	615
HPzAm4M (2)	3458, 3349, 3308, 3134	1508	777	860	563
[Sb(PzAm4M)Cl₂] (17)	3444, 3361, 3273	1547	752	862	625
HPzAm4E (3)	3439, 3343, 3333, 3150	1537	777	856	571
[Sb(PzAm4E)Cl₂] (18)	3361, 3275, 3232	1539	755	864	631
HPzAm4Cex (4)	3443, 3343, 3244, 3142	1539	785	858	592
[Sb(PzAm4Cex)Cl₂] (19)	3376, 3266, 3230, 3207	1529	747	863	643
HPzAm4Ph (5)	3414, 3309, 3275, 3225	1545	762	860	594
[Sb(PzAm4Ph)Cl₂] (20)	3371, 3275, 3211, 3175	1544	752	856	661

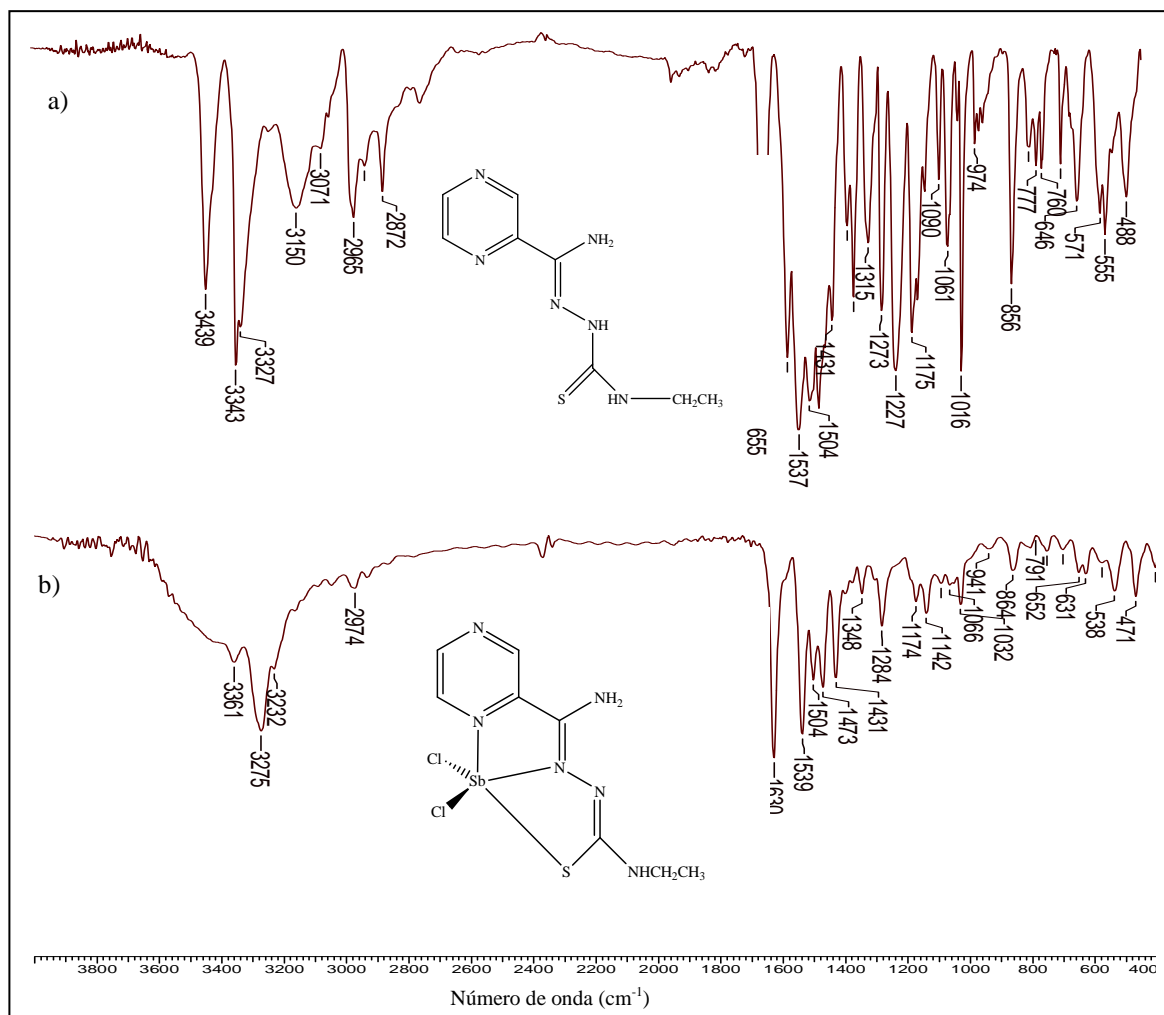
Legenda: ν = estiramento, γ = deformação fora do plano, β = deformação anel, ρ = deformação fora do plano

A vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$, observada em $762\text{--}799\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das bases livres, desloca-se para $741\text{--}755\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação pelo enxofre. O deslocamento significativo está de acordo com a complexação do enxofre na forma de tiolato, ou seja, as tiossemicarbazonas encontram-se desprotonadas no N(3) nos complexos (Reis et al., 2010; Parrilha 2012).

A banda correspondente ao modo de deformação do anel pirazínico fora do plano $\rho(\text{pz})$ situada na região de $563\text{--}594\text{ cm}^{-1}$ das tiossemicarbazonas livres está situada a frequências maiores nos complexos metálicos, o que seria indicativo da coordenação do ligante ao metal através do nitrogênio pirazínico (Castineiras et al., 2014).

Na Figura 55 são apresentados como exemplo, os espectros no infravermelho da tiossemicarbazona HPzAm4E e de seu complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$.

Figura 55– Espectro no IV da tiossemicarbazona HPzAm4E (a) e do complexo [Sb(PzAm4E)Cl₂] (b), respectivamente, obtidos em pastilha de KBr (4000-400 cm⁻¹)

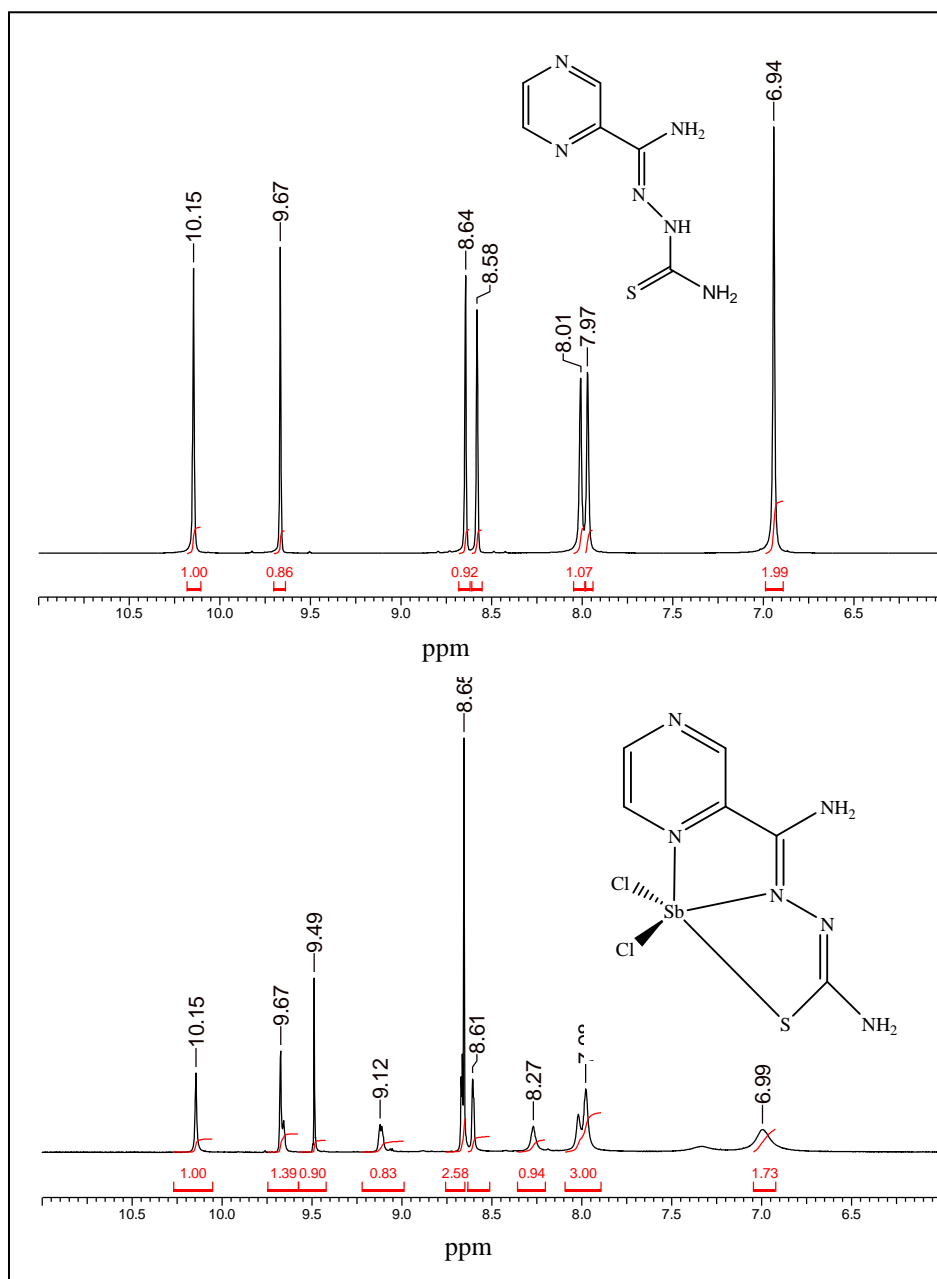


7.1.3–Ressonância Magnética Nuclear de Sólido

Os complexos de antimônio(III) não têm boa solubilidade em CDCl₃ e CD₃OD, enquanto que também devido a limitações da solubilidade, foram obtidos seus espectros apenas de RMN de ¹H em DMSO-*d*₆. De acordo com os espectros, confirma-se a formação dos complexos, no entanto também observa-se que parte desses compostos descomplexaram em solução, uma vez que também foram observados sinais das tiossemicarbazonas livres. Essa proposta de que as tiossemicarbazonas livres não são impurezas, mas sim provenientes da descomplexação dos compostos de antimônio(III), são corroborados por análise elementar, cujos dados tiveram boa concordância com os dados teóricos, e por espectroscopia no IV,

uma vez que não foram observadas bandas das tiossemicarbazonas livres nos espectros dos complexos. Como exemplo, é mostrado na Figura 56 o espectro da tiossemicarbazona HPzAm4E e de seu complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Figura 56– Espectro ampliado (6 a 11 ppm) de RMN ^{13}H de em $\text{DMSO-}d_6$ de HPzAm4DH (1) e do complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (16)

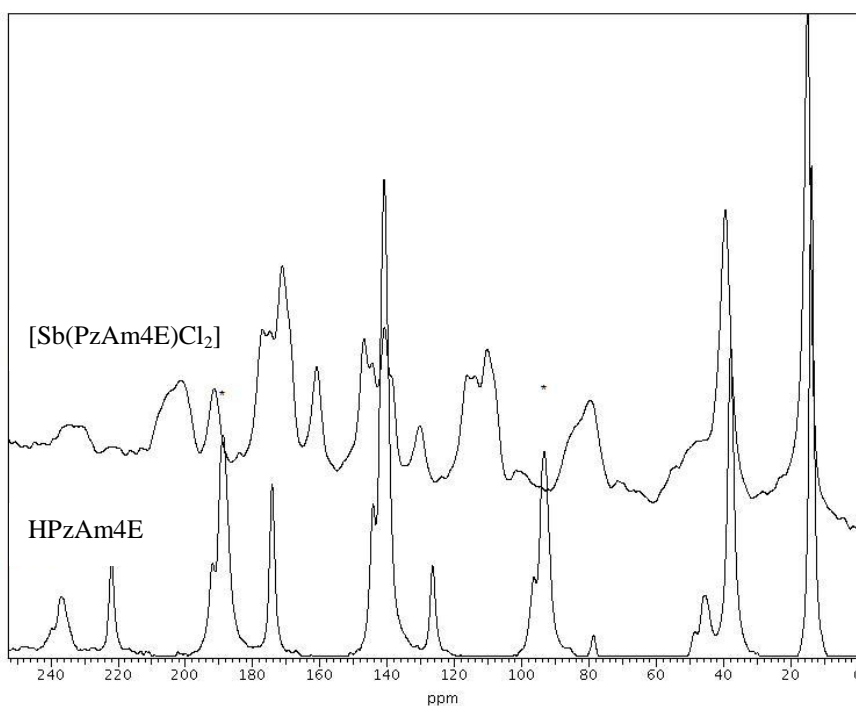


Para confirmar que não há impureza das tiossemicarbazonas nos complexos em seu estado sólido, procuramos obter os espectros de RMN de sólido desses compostos. Diferentemente dos espectros de RMN em solução, que apresentam uma acentuada isotropia

em seus sinais, o RMN no estado sólido não se apresenta da mesma forma pelo fato de apresentar espectros largos e muitas vezes com baixa resolução, o que dificulta sua análise quando comparada aos sinais em solução. Esse fato é justificado pelas propriedades intrínsecas do estado sólido, em que os movimentos são minimizados (Tishmack, Bugay, Byrn, 2003; Dybowski, Bai, Bramer, 2004).

Como aplicação de RMN de sólidos tem-se a caracterização estrutural de complexos inorgânicos, dentre outras. Os núcleos mais estudados são ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{29}Si (Fyfe, 1998; Veloso, Menezes, 1999). Na Figura 57 temos o exemplo de espectros de RMN de ^{13}C de sólido de e de seu complexo

Figura 57– Espectro de RMN ^{13}C de sólido de HPzAm4E e do complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$



Os resultados na análise mostram-se coerentes com resultados descritos por Raul (2007) em comparação com complexos semelhantes em solução. Os sinais $\delta = 17$ e 38 ppm são referentes aos carbonos nos grupos CH_3 e CH_2 , respectivamente. A região em torno de 150 ppm corresponde aos carbonos pirazínicos, que pela baixa resolução não podem ser identificados. O sinal em $\delta = 175$ ppm é correspondente a $\text{C}=\text{S}$. Os demais sinais que apareceram são chamados de bandas laterais, que aparecem quando não há boas condições de obtenção do espectro. Pela comparação dos deslocamentos do ligante com o complexo podemos afirmar que houve complexação, colaborando com resultados de espectroscopia no

infravermelho. Os dados mostram ainda que não há sinais da tiossemicarbazona livre no complexo.

7.1.4–Espectrometria de massas

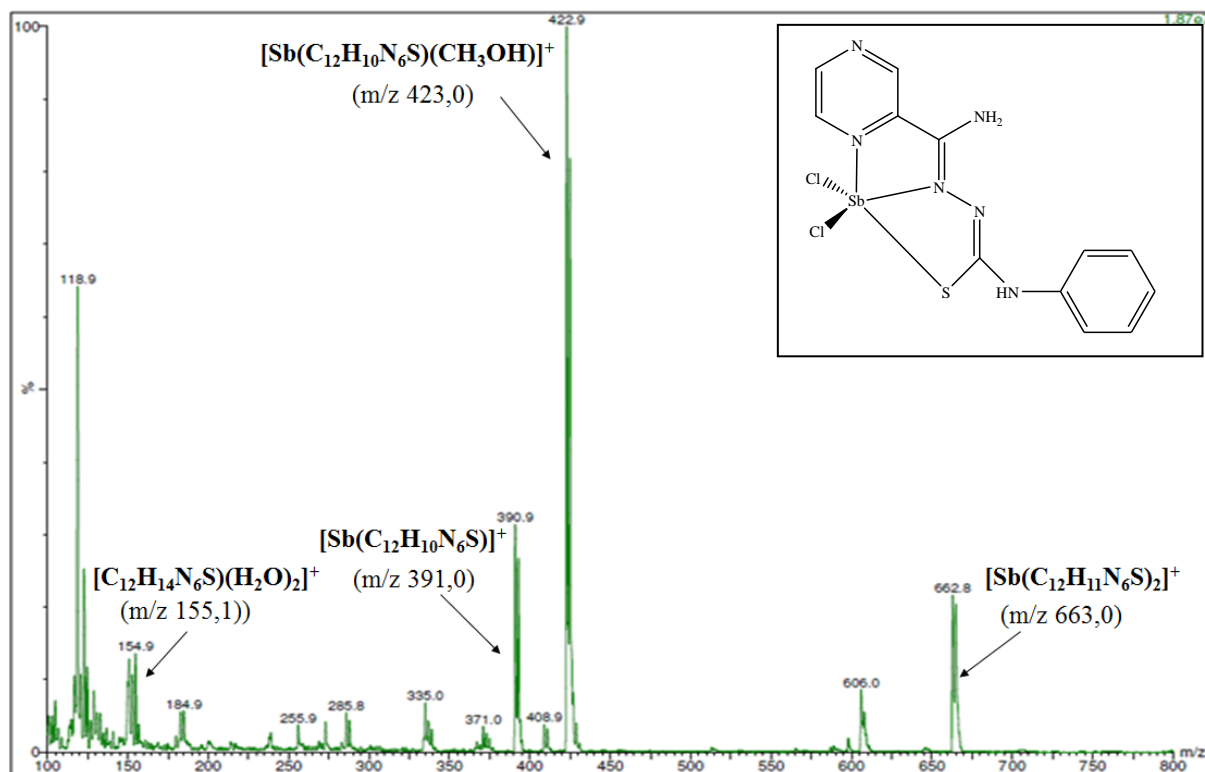
Todos os compostos foram solubilizados em metanol grau espectroscópico e os espectros foram obtidos no modo positivo. Para os complexos de antimônio(III) não foram observados os sinais correspondentes aos íons moleculares, para os complexos **18**, **19** e **20** um sinal é atribuído à uma espécie contendo a tiossemicarbazona duplamente desprotonada, um íon Sb^{3+} e uma molécula de metanol. Por outro lado, os espectros apresentam em comum a presença da espécie $[\text{Sb}(\text{L})_2]^+$ (espécie produzida no processo de ionização), onde podemos confirmar a presença do íon metálico. Os dados e atribuições para esses picos são mostrados na Tabela 32.

Tabela 32–Dados de ESI–MS para os complexos de antimônio(III)

Composto	m/z (abundância relativa)	
	[atribuição]	
$[\text{Sb}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ (16) ($\text{C}_6\text{H}_7\text{SbCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	–	508,9 (13%) $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{SbN}_{12}\text{S}_2]^+$
$[\text{Sb}(\text{PzAm4M})\text{Cl}_2]$ (17) ($\text{C}_7\text{H}_9\text{SbCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	–	539,0 (11%) $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{SbN}_{12}\text{S}_2]^+$
$[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$ (18) ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{SbCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	375(15%) $[\text{Sb}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{SbN}_6\text{S})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$	567(33%) $[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{SbN}_{12}\text{S}_2]^+$
$[\text{Sb}(\text{PzAm4Cex})\text{Cl}_2]$ (19) ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{SbCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	429,9(58%) $[\text{Sb}(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{SbN}_6\text{S})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$	675(38%) $[\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{SbN}_{12}\text{S}_2]^+$
$[\text{Sb}(\text{PzAm4Ph})\text{Cl}_2]$ (20) ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{SbCl}_2\text{N}_6\text{S}$)	422,9(100%) $[\text{Sb}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{SbN}_6\text{S})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$	662,8(25%) $[\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{SbN}_{12}\text{S}_2]^+$

Na Figura 58 mostramos como exemplo o espectro de massas do complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4Ph})\text{Cl}_2]$.

Figura 58– Espectro ESI-MS de $[\text{Sb}(\text{PzAm4Ph})\text{Cl}_2]$ em metanol, obtido no modo positivo.



7.2–Atividade biológica

No presente trabalho foi investigada a ação citotóxica e antituberculose dos complexos em comparação com seus compostos de coordenação, os quais serão apresentados e discutidos a seguir.

7.2.1 –Atividade citotóxica

Os complexos sintetizados (**16-20**) foram testados quanto à atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon humano), OVCAR-8 (câncer de ovário humano), e SF-295 (glioblastoma humano).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo método descrito na seção 3.3.5. Os resultados, expressos em porcentagem de inibição de crescimento são apresentados na Tabela 33, em comparação com os dados para as tiossemicarbazonas livres, para o sal SbCl_3 e para a pirazinamida (PZA).

Tabela 33–Avaliação da atividade citotóxica das tiossemicarbazonas e dos complexos de antimônio(III), em comparação com o sal SbCl_3 e pirazinamida (PZA)

Composto	% de Inibição do Crescimento (média \pm desvio padrão)		
	HCT–116	OVCAR–8	SF–295
HPzAm4DH (1)	37,05 \pm 4,49	7,74 \pm 3,87	17,67 \pm 0,22
[Sb(PzAm4DH)Cl ₂] (16)	29,27 \pm 1,36	1,83 \pm 0,44	0,24 \pm 4,32
HPzAm4M (2)	11,19 \pm 5,96	23,67 \pm 10,09	24,44 \pm 1,58
[Sb(PzAm4M)Cl ₂] (17)	32,72 \pm 4,73	3,98 \pm 0,65	16,57 \pm 0,29
HPzAm4E (3)	44,72 \pm 14,27	52,60 \pm 8,43	-7,64 \pm 42,77
[Sb(PzAm4E)Cl ₂](18)	41,53 \pm 0,58	18,68 \pm 3,37	24,90 \pm 4,22
HPzAm4Cex (4)	-10,30 \pm 8,25	6,17 \pm 5,00	39,10 \pm 0,49
[Sb(PzAm4Cex)Cl ₂] (19)	87,53 \pm 2,07	56,09 \pm 2,70	–
HPzAm4Ph (5)	15,36 \pm 6,77	19,47 \pm 4,01	29,02 \pm 1,15
[Sb(PzAm4Ph)Cl ₂](20)	31,11 \pm 11,57	47,04 \pm 3,31	–
SbCl_3	42,17 \pm 3,18	27,83 \pm 0,44	16,29 \pm 0,49
PZA	7,93 \pm 0,93	34,72 \pm 6,27	–

Apenas o complexo [Sb(PzAm4Cex)Cl₂](**19**) apresentou atividade citotóxica frente a célula HCT–116 superior à exercida pela tiossemicarbazona. Neste caso, a coordenação ao antimônio(III) aumentou a atividade citotóxica do composto HPzAm4Cex.

De um modo geral os baixos valores de % de inibição do crescimento dos compostos (**16-18 e 20**) sugerem que os complexos de antimônio(III) não apresentam uma atividade significativa contra as linhagens de células tumorais testadas, semelhantes às tiossemicarbazonas livres. Os resultados foram semelhantes à atividade apresentada pelo cloreto de antimônio(III).

7.2.2–Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*

Foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana dos complexos de antimônio(III) contra *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados obtidos estão na Tabela 34, os quais permitem determinar a concentração mínima dos compostos que inibem a proliferação bacteriana (CIM), com base no método empregado. Para cada composto, a menor concentração na Tabela 35 com a indicação “Sen” corresponde à CIM, a qual está apresentada na Tabela 36 em unidade de concentração molar.

Tabela 34– Avaliação da atividade antimicrobacteriana dos complexos de antimônio(III) em comparação com as tiossemicarbazonas (1–5), $SbCl_3$ e pirazinamida (PZA)

Composto	100	50	25	12,5	6,25	3,12
	$\mu g / mL$	$\mu g / mL$	$\mu g / mL$	$\mu g / mL$	$\mu g / mL$	$\mu g / mL$
HPzAm4DH (1)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Sb(PzAm4DH)Cl ₂] (16)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
HPzAm4M (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Sb(PzAm4M)Cl ₂] (17)	sem	Sen	Sen	Res	Res	Res
HPzAm4E (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Sb(PzAm4E)Cl ₂] (18)	Sen	Sen	Sen	Res	Res	Res
HPzAm4Cex (2)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Sb(PzAm4Cex)Cl ₂] (19)	Sen	Sen	Sen	Sen	Res	Res
HPzAm4Ph (3)	Res	Res	Res	Res	Res	Res
[Sb(PzAm4Ph)Cl ₂] (20)	Sen	Sen	Res	Res	Res	Res
$SbCl_3$	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
PZA	Res	Res	Res	Res	Res	Res

Sen- Sensível/**Res-** Resistente

Tabela 35–Atividade *in vitro*^a dos complexos 16-20, suas respectivas tiossemicarbazonas livres, do sal $SbCl_3$ e do fármaco pirazinamida(PZA) contra *M. tuberculosis* H37Rv suscetíveis a ambas rifampicina e isoniazida

Composto	CIM($\mu mol L^{-1}$)	Composto	CIM($\mu mol L^{-1}$)
HPzAm4DH (1)	> 509,61	HPzAm4Cex (4)	>359,22
[Sb(PzAm4DH)Cl ₂] (16)	> 257,81	[Sb(PzAm4Cex)Cl ₂](19)	26,60
HPzAm4M (2)	> 475,60	HPzAm4Ph (5)	>367,20
[Sb(PzAm4M)Cl ₂] (17)	62,20	[Sb(PzAm4Ph)Cl ₂] (20)	107,78
HPzAm4E (3)	> 445,85	$SbCl_3$	438,37
[Sb(PzAm4E)Cl ₂] (18)	60,10	PZA	> 812,28

Legenda:^a Atividade antimicrobacteriana expressa como Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Conforme apresentado anteriormente, as tiossemicarbazonas não são ativas contra as espécies *M. tuberculosis* nas concentrações estudadas e utilizando-se o método MABA. Por outro lado, o sal do metal mostrou atividade, ainda que baixa. A baixa atividade de sais de metais pode estar relacionada à sua limitação quanto à passagem para o meio intracelular, o que pode ser contornado por meio da coordenação a ligantes adequados. O estudo da ação do

complexo $[\text{Sb}(\text{PzAm4DH})\text{Cl}_2]$ frente a *M. tuberculosis* indica que este composto foi o único inativo nas concentrações entre 100 e 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

No entanto, a atividade antimicrobiana dos complexos $[\text{Sb}(\text{PzAm4M})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{PzAm4Cex})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}(\text{PzAm4Ph})\text{Cl}_2]$ foi melhor do que a das tiosemicarbonas livres nas concentrações de 100 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A coordenação ao antimônio(III) promoveu uma melhora significativa na atividade no caso destes compostos, indicando que a complexação foi uma boa estratégia para obter compostos com melhor ação antituberculose.

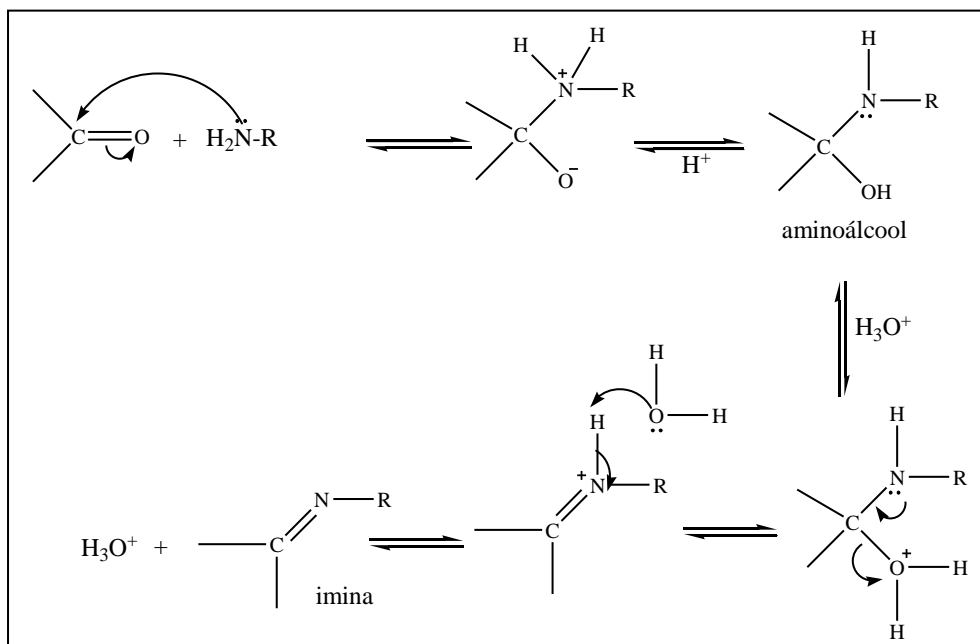
Vale salientar ainda a escolha do íon metálico como algo determinante para a atividade antituberculose. Bismuto(III) e antimônio(III) pertencem ao mesmo grupo na tabela periódica e portanto têm algumas propriedades químicas em comum. No entanto, os complexos sintetizados neste trabalho com esses íons apresentam propriedades biológicas distintas: os compostos de bismuto(III) são inativos frente a *M. tuberculosis*, enquanto que em geral os complexos de antimônio são potentes. Esses dados evidenciam a seletividade dos compostos no que se refere ao tipo de íon metálico empregado.

8-AMINAS E BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE *p*-NITROFENILETILENODIAMINA

O composto *p*-nitrofeniletilenodiamina (**21**) e seus derivados foram caracterizados por IV, RMN ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas. Os dados obtidos pelas técnicas utilizadas para caracterização desses compostos estão apresentadas nas Tabelas 36–39.

O mecanismo de formação das iminas (Figura 59), de maneira simplificada, começa com a adição nucleofílica da amina sobre o carbono eletrofílico do aldeído, formando um aminoalcol como intermediário, o qual na continuação perde uma molécula de água para formar a imina.

Figura 59–Mecanismo de reação de formação de iminas.



Fonte: O autor, 2016.

8.1– Caracterização das aminas e Bases de Schiff

8.1.2–Espectroscopia no Infravermelho

A banda devida ao estiramento da ligação N-H de aminas normalmente é observada na região entre 3000 e 3500 cm^{-1} . Em iminas, espera-se uma banda entre 1630 - 1700 cm^{-1} correspondente a vibração da ligação C=N (Silverstein et al., 2005). Os compostos (**21–32**)

apresentam bandas entre 3416 e 3170 cm^{-1} atribuídas a $\nu(\text{N-H})$ e a banda de $\nu(\text{C=N})$ das bases de Schiff (**23–32**) ocorre em torno de 1640 cm^{-1} .

Tabela 36– Principais bandas no IV (cm^{-1}) das amins e bases de Schiff derivadas da p-nitrofeniletlenodiamina

Composto	νNH	$\nu(\text{C=N})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{NO}_2)$	$\nu(\text{C-N})/\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$
(21)	3360 3170	–	1507	1285
(22)	3372, 3175	–	1538	1281
(23)	3336	1628	1541	1274
(24)	3416	1644	1522	1266
(25)	3338	1648	1498	1207
(26)	3289	1647	1503	1246
(27)	3340	1645	1498	1266
(28)	3358	1632	1503	1242
(29)	3348	1640	1513	1250
(31)	3323	1644	1503	1240
(30)	3289	1647	1503	1246
(32)	3355	1644	1515	1277

Legenda: ν_{ass} = estiramento assimétrico ν_{s} = estiramento simétrico

8.1.3 –Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

As análises dos compostos (**21–32**) por RMN foram realizadas em $\text{DMSO-}d_6$. Na Figura 60 é apresentada a numeração utilizada para atribuição dos átomos de hidrogênio e carbono. Como exemplo são apresentados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da imina (**23**) nas Figuras 61 e 62, respectivamente. As atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C para os compostos **21–32** são encontradas nas Tabelas 37 e 38.

Figura 60– Numeração utilizada para atribuição dos átomos de hidrogênio e de carbono das aminas e iminas.

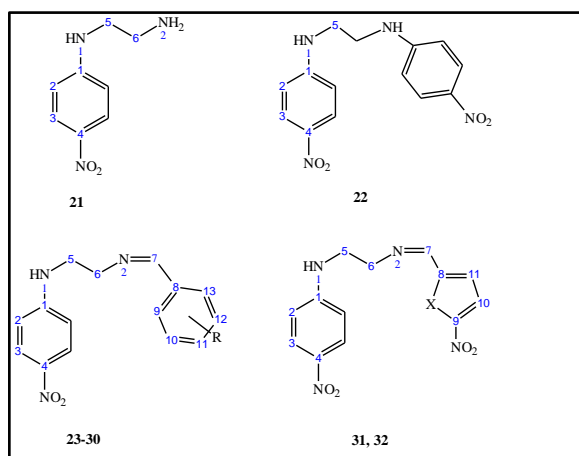


Figura 61– Espectro de RMN de ^1H da base de Schiff **31**, obtido em DMSO-d_6

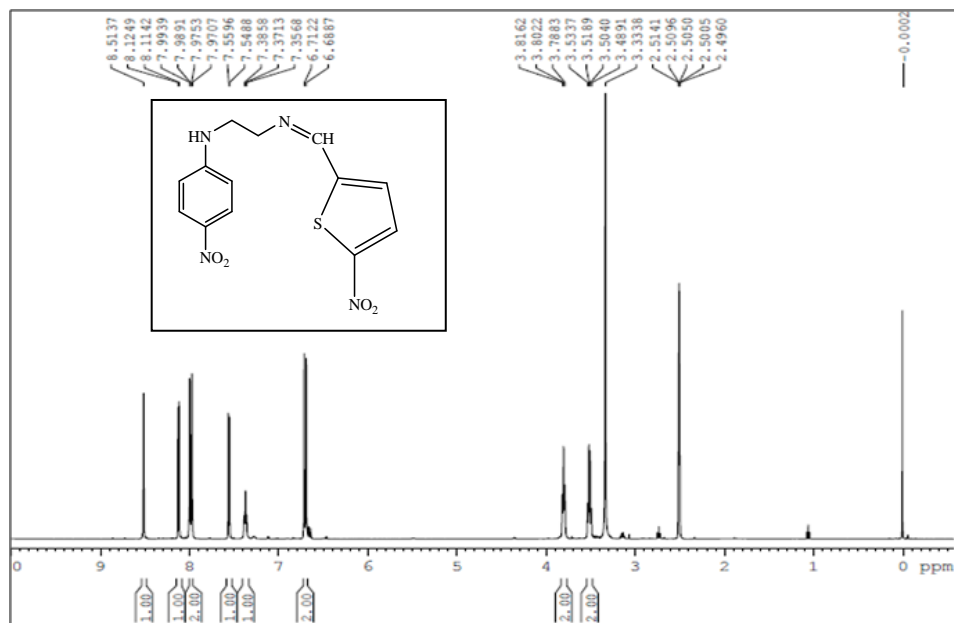


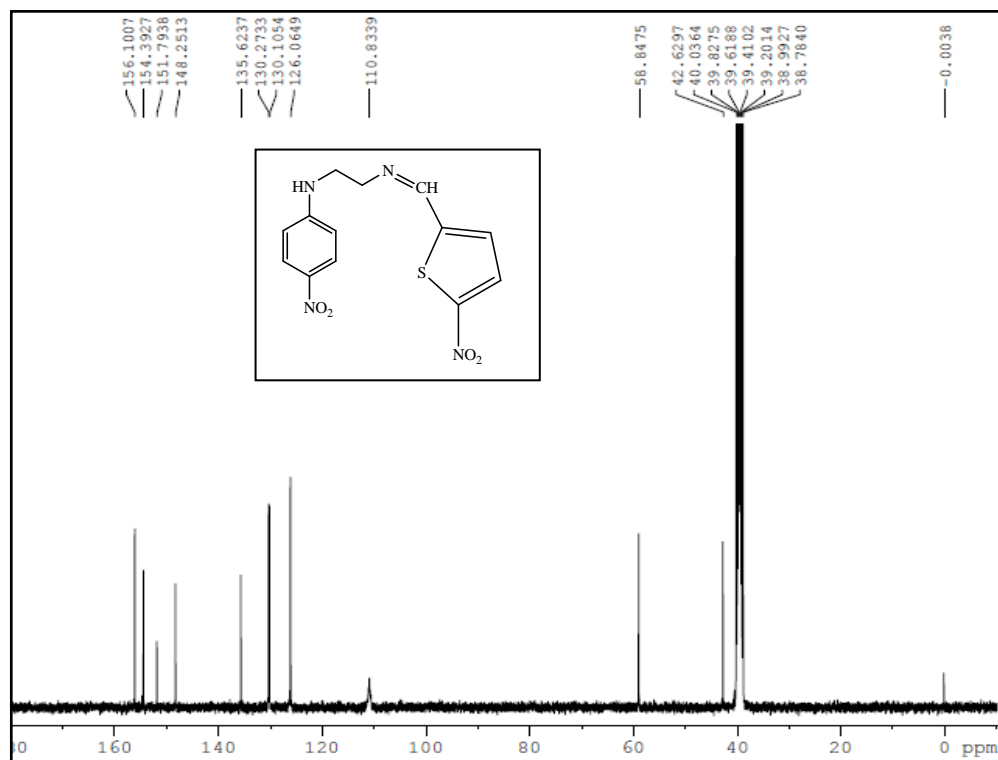
Figura 62– Espectro de RMN de ^{13}C da base de Schiff(31), obtido em DMSO-d_6 

Tabela 37– Atribuição (A), número de hidrogênios (N°), deslocamento químico (δ), multiplicidade^a, J (Hz) dos sinais de RMN de ¹H das aminas e iminas derivadas da *p*-nitrofeniletilenodiamina

A	N°	δ (ppm)											
		(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)
H5	2	3,23(t) J= 6,1	3,40(m)	3,53 (q) J= 5,9	3,51 (q) J= 5,5	3,47(q) J= 5,8	3,50(q) J= 5,9	3,45(m)	3,53(s)	3,49(q) J= 7,09	3,57(q) J= 5,9	3,51 (q) J= 5,9	3,53(m)
H6	2	2,79(t) J= 6,4		3,79 (t) J=5,6	3,80 (t) J= 5,6	3,70(t) J= 5,8	3,77 (t) J= 5,6	3,69(t) J= 5,9	3,77(m)	3,74(m)	3,82(t) J= 5,8	3,81(t) J= 5,5	3,83(m)
H7				8,54 (s)	8,48(s)	8,34(s)	8,98(s)	8,11(s)	8,51(s)	8,38(s)	8,69(s)	8,52(s)	8,31(s)
N1H	1	7,33 (t) J= 4,9	7,37 (m)	-	8,88 (m)	9,93(m)	8,88(m)				8,88(m)	7,37(m)	7,26(m)
N2H	2	3,97 (m)	7,37 (m)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCH ₃	3	-	-	-	-	-	-	-	3,77(m)	3,74(m)	-	-	-
H2	2	6,66 (d) J= 9,5	6,70(m)	6,71 (d) J= 9,3	6,71 (d) J= 9,3	6,71(d) J= 9,3	6,71 (d) J= 9,3	6,69(m)	6,71(d) J= 9,5	6,71(d) J= 9,3	6,74(d) J= 9,3	6,71 (m)	6,71(m)
H3	2	7,99 (m)	8,00 (m)	7,98 (m)	7,99 (d) J= 9,3	7,99(d) J= 9,3	7,98 (m)	7,98(m)	7,99(d) J= 9,29	7,99(d) J= 9,3	8,00(d) J= 9,05	7,98(m)	7,77(m)
H9								6,74(d) J= 8,07					
H10	1			6,88 (m)		7,43(t) J= 5,5	7,43(m)			6,32(d) J= 2,5	6,66(d) J= 9,5	8,11(m)	7,99(m)
H11	1			7,32 (m)	7,45 (m)		6,79(t) J= 3,2		6,98(m)		7,48(t) J= 5,9	7,55(m)	7,39(m)
H12	1			6,88 (m)	6,64 (t) J= 7,8	6,27(t) J= 8,6		6,96(m)	6,79(m)	7,26(d) J= 8,6			
H13	1			7,42(m)	6,83 (m)	7,17(d) J= 8,3	6,98 (m)	7,17(d) J= 8,3	7,44(m)	6,38(d) J=8,8	8,40(m)		

^aInformações sobre multiplicidade encontram-se entre parêntesis. s = simpleto; d= dupleteo; t= tripleto; q=quarteto; m= multipleteo

Tabela 38– Atribuições (A) e deslocamentos químicos (ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C das aminas e bases de Schiff (**21–32**).

A	δ (ppm)											
	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)
C5	45,85	41,31	43,02	43,06	43,09	43,10	43,09	42,89	42,98	41,97	42,63	42,73
C6	40,48		57,25	56,24	55,92	57,48	55,92	55,66	55,14	51,78	58,84	59,37
C7			167,12	167,29	165,96	166,86	161,81	167,14	165,82	176,13	156,10	152,10
OCH ₃								56,68	55,50			
C1	154,67	154,39	154,48	154,45	154,37	152,95	154,37	154,35	154,36	154,12	154,39	154,32
C2	110,55	110,97	110,92	110,85	106,78	110,85	106,78	110,85	111,92	111,04	110,83	110,85
C3	126,16	126,23	126,21	126,21	126,11	126,22	126,11	126,11	126,10	132,02	126,06	126,08
C4	135,32	135,82	135,76	135,80	135,63	135,74	135,63	135,65	135,66	134,25	135,62	135,65
C8			118,66	117,53	108,51	124,52	108,51	114,71	110,79	122,12	148,25	151,17
C9			160,51	151,26	164,22	154,49	164,22	147,91	163,18	167,54	151,79	151,90
C10			116,43	145,89	102,40	118,25	102,40	151,42	100,87	114,08	130,11	
C11			132,35	117,61	161,64	119,89	161,64	118,25	151,90	129,03	130,27	116,24
C12			118,66	118,09	115,11	149,28	115,11	117,60		136,02		
C13			131,69	121,86	133,30	116,49	133,30	123,10		126,08		

A análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C confirmam a estrutura proposta para os compostos. O sinal em aproximadamente $\delta = 160,0$ é um simpleto, integrado para um hidrogênio, o qual corresponde ao hidrogênio do grupo imina (H3).

8.1.4–Espectrometria de massas (ESI–MS)

Com o intuito de confirmar a composição dos compostos (**21–32**) sintetizados realizou-se o estudo através de espectrometria de massas com ionização por *electrospray*. Todos os compostos foram solubilizados em metanol e os espectros adquiridos nos modos positivo e negativo dependendo do composto. Em todos os espectros observa-se o pico correspondente ao íon molecular das aminas e iminas (ver Apêndice D). Os dados encontram-se sumarizados na Tabela 40.

Tabela 39– Dados de ESI–MS para *p*-nitrofeniletilenodiamina (**21**) e seus derivados (**22–32**)

Composto	m/z ^a experimental	m/z teórico	Atribuição	Composto	m/z experimental	m/z teórico	Atribuição ^b
(21)	181,8 (100)	181,2	[M-H] ⁺	(27)	300,2 (100)	300,3	[M] ⁻
(22)	324,9 (82)	325,3	[M-H] ⁺	(28)	337,9 (100)	337,3	[M-H] ⁺
(23)	284,0 (100)	284,3	[M] ⁻	(29)	337,9 (100)	337,3	[M-H] ⁺
(24)	300,1 (100)	300,3	[M] ⁻	(30)	352,9 (100)	352,3	[M-H] ⁺
(25)	323,9 (100)	324,3	[M-H] ⁺	(31)	342,9 (100)	343,3	[M-H] ⁺
(26)	323,9 (100)	324,3	[M-H] ⁺	(32)	327,0 (100)	327,3	[M-H] ⁺

Legenda:^aIR = intensidade relativa entre parêntesis, dado em %; ^b[M-H]⁺ = íon molecular protonado; [M]⁻ = íon molecular desprotonado

8.2–**Atividade biológica das bases de Schiff**

8.2.1 –Atividade citotóxica

As bases de Schiff e as aminas sintetizadas foram testadas quanto à atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais OVCAR–8 (câncer de ovário humano), HCT–116 (câncer de cólon humano) e SF–295 (glioblastoma humano).

A atividade antiproliferativa foi avaliada segundo o método descrito na seção 3.3.5. Os resultados, expressos em porcentagem de inibição de crescimento são apresentados na Tabela 40.

Tabela 40– Avaliação da atividade citotóxica de **21**, **22** e das bases de Schiff (**23–32**) frente a HCT–116, OVCAR–8 e SF–295

Composto	% de inibição do crescimento (média ± desvio padrão)		
	HCT–116	OVCAR–8	SF–295
21	95,65±1,70	96,63±0,91	88,62±2,23
22	6,65±10,48	-2,75±1,02	35,13±10,56
23	-4,65±4,98	-1,87±0,45	43,65±1,81
24	8,68±15,98	6,41±1,02	36,94±14,60
25	14,52±16,90	24,48±5,45	30,35±6,60
26	7,76±8,12	-0,90±1,36	51,12±4,78
27	37,86±8,78	48,83±7,61	38,40±2,31
28	96,30±0,79	94,54±0,45	73,28±1,32
29	18,04±3,01	7,21±2,39	49,19±1,07
30	92,78±4,19	68,91±33,97	55,61±2,06
31	2,20±3,67	0,46±3,07	40,85±1,98
32	96,20±3,01	74,21±8,98	60,92±3,30

Os melhores resultados obtidos foram para os compostos **21**, **28**, **30** e **32** contra as células tumorais. Os demais compostos não tiveram resultados significativos. Estes compostos mais ativos foram selecionados para testes posteriores de determinação de concentração de composto que inibe em 50% o crescimento celular (CI₅₀).

O composto **21** é consideravelmente mais potente do que **22**, indicando que a substituição de um hidrogênio da amina por outro grupo *p*-nitrofenil faz com que haja uma diminuição da atividade.

Comparando-se as estruturas dos compostos **24**, **25** e **26** podemos perceber que a substituição das hidroxilas no anel aromático em posições *orto*, *meta* ou *para* não faz diferença quanto à atividade citotóxica, sendo esta em geral baixa para esses isômeros de posição. Por outro lado, foi observado que o composto **28**, em que grupo substituinte OCH₃ encontra-se na posição *orto* em relação à hidroxila, inibiu em mais de 70% o crescimento das células tumorais, enquanto que seu isômero *meta*(**29**) não é ativo.

Também é observada significativa diferença no comportamento biológico quando substituímos um heteroátomo em anel aromático. Assim, o composto **31**, que contém um grupo tiofeno não apresenta atividade contra as células tumorais, enquanto que o composto equivalente **32**, que contém um grupo furano, é altamente tóxico para as linhagens de células tumorais.

8.2.2 –Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*

Foram realizados testes quantitativos para determinar a atividade antimicrobiana das aminas e bases de Schiff contra *M.tuberculosis*. O etambutol foi utilizado como fármaco de referencia. Os resultados obtidos estão na Tabela 41. Para cada composto, a menor concentração na Tabela 41 com a indicação “Sen” corresponde à CIM, a qual está apresentada na Tabela 42 em unidade de concentração molar.

Tabela 41– Avaliação da atividade antimicobacteriana das aminas e bases de Schiff

Composto	100 µg / mL	50 µg / mL	25 µg / mL	12,5 µg / mL	6,25 µg / mL	3,12 µg / mL
21	Res	Res	Res	Res	Res	Res
22	Res	Res	Res	Res	Res	Res
23	Res	Res	Res	Res	Res	Res
24	Sen	Sen	Sen	Res	Res	Res
25	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
26	Res	Res	Res	Res	Res	Res
27	Sen	Res	Res	Res	Res	Res
28	Res	Res	Res	Res	Res	Res
29	Res	Res	Res	Res	Res	Res
30	NR	NR	NR	NR	NR	NR
31	NR	NR	NR	NR	NR	NR
32	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Res

Sen- Sensível / **Res-** Resistente /NR-não realizado

Tabela 42– Atividade *in vitro*^a das aminas e bases de Schiff contra *M. tuberculosis* H37Rv

Composto	CIM (µmol L ⁻¹)	Composto	CIM (µmol L ⁻¹)
(21)	>18,12	(27)	30,13
(22)	>30,23	(28)	> 30,53
(23)	>28,53	(29)	> 30,53
(24)	7,53	(30)	NR
(25)	30,13	(31)	NR
(26)	>30,13	(32)	0,95
ETAMBUTOL	15,30		

Legenda:^a Atividade antimicobacteriana expressa como Concentração Inibitória Mínima (CIM);

Pela análise da Tabela 42 que mostra a CIM para os compostos podemos perceber que a maioria dos compostos não teve ou apresentou baixa atividade nas concentrações testadas.

A avaliação biológica sugere que o número, a posição e os substituintes são importantes contra *Mycobacterium tuberculosis*. A posição e o número de hidroxilas são críticos para a atividade biológica. Por exemplo, quando um grupo hidroxila está presente no anel, não há efeito na bactéria. Contudo, o aumento no número de hidroxilas e sua posição *para* e *orto*-substituído aumentou a atividade biológica, como apresentado pelos compostos (27) e (24) respectivamente. No caso do composto (32), a mudança de enxofre por oxigênio modificou substancialmente a atividade antimicobacteriana. Vale ressaltar que os compostos mais ativos, 24 e 32, foram inclusive mais potentes do que o fármaco etambutol, sugerindo que estes são promissores compostos a serem submetidos a estudos subsequentes, como os de determinação do índice de seletividade e estudos *in vivo*.

CONCLUSÃO

O presente trabalho consistiu na síntese, caracterização e investigação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas da pirazinamida, seus complexos metálicos e de bases de Schiff. Foram investigadas as atividades citotóxicas contra células tumorais humanas e antimicrobiana contra *M. Tuberculosis*.

Foram sintetizadas e caracterizadas cinco tiossemicarbazonas sendo três já descritas na literatura e duas inéditas. Foram sintetizados 14 complexos metálicos inéditos pela reação dos ligantes tiossemicarbazonas com os sais de Ga(III), Bi(III) e Sb(III). As sínteses foram em relação molar 1:1, exceto com nitrato de gálio(III), onde as relações foram 2:1 ligante entre metal. Os dados de análises elementares estão consistentes com as estruturas propostas.

Os espectros no IV dos complexos sintetizados, em todos os casos, sugerem que a coordenação das tiossemicarbazonas ao centro metálico é realizada através do enxofre, do átomo de nitrogênio imínico e do átomo de nitrogênio N(1) da pirazina. Os espectros dos complexos de gálio nos permitem indicar que o íon nitrato se comporta como contra íon.

Os sinais esperados de RMN de ^{13}C e de ^1H foram observados nos espectros dos compostos de gálio(III) e de bismuto(III) e confirmam as estruturas propostas. Nos complexos de gálio(III) o deslocamento dos sinais de carbono C(7), C(8) da pirazina com relação às tiossemicarbazonas livres sugerem o envolvimento dos nitrogênios pirazínico e imínico e do enxofre na coordenação ao centro metálico.

Nos espectros de massas foi possível determinar para a maioria dos compostos sintetizados o pico do íon molecular. Para os de bismuto ainda foi possível analisar o perfil isotópico dos compostos.

As tiossemicarbazonas e os complexos de bismuto(III) mostraram baixa atividade contra as células tumorais testadas e contra *Mycobacterium tuberculosis*, a principal bactéria causadora da tuberculose. A coordenação ao bismuto e a gálio(III) constitui uma estratégia interessante visto que os compostos $[\text{Ga}(\text{PzAm4Cex})_2]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Sb}(\text{PzAm4M})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{PzAm4E})\text{Cl}_2]$, $[\text{Sb}(\text{PzAm4Cex})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Sb}(\text{PzAm4Ph})_2]$ (**9**, **17-20**) tiveram atividade nos testes biológicos realizados.

As bases de Schiff foram devidamente caracterizadas e os compostos 24 e 32 foram os mais ativos contra *M. Tuberculosis*, sugerindo que são promissores candidatos a estudos posteriores *in vivo*.

Em estudos posteriores seria interessante avaliar o efeito citotóxico em outras linhagens tumorais, e o mecanismo de ação desses compostos. Finalmente, realizar outros

ensaios biológicos com o intuito de ampliar a investigação do perfil farmacológico tanto das tiossemicarbazonas quanto dos complexos metálicos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, R. Medicinal inorganic chemistry. *Chimia.*, v. 61, n. 11, p. 691, 2007.
- ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes aneoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA. *Quim. Nova*, v. 28, p. 118-129, 2005.
- AMAR, J.B. et al. Traitement de la tuberculose. *Revue Pneumologie Clinique*, v. 71, p. 122-129, 2015.
- AMIM, R.S. et al. Cytotoxicity and leishmanicidal activity of isoniazid-derived hydrazones and 2-pyrazineformamide thiosemicarbazones. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, p. 769-777, 2015.
- ARION, V.B. et al. Synthesis, structure, spectroscopic and in vitro antitumor studies of a novel gallium complex with 2-acetylpyridine ⁴N-dimethylthiosemicarbazone. *J. Inorg. Biochem.*, v. 91, p. 298-305, 2002.
- ARNESANO, F. et al. Probing the interaction of cisplatin with the human copper chaperone Atox1 by solution and in-cell NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 133, p. 18361-18369, 2011.
- BACHER, F.; ARION, V.B. Ruthenium compounds as antitumor agents: new developments. *Ref. Module Chem. Mol. Sc. Chem. Eng.*, 2014.
- BAGULEY, B.C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol. Biotechnol.*, v. 46, p. 308-316, 2010
- BAHL, D. et al. Structure-activity relationships of mononuclear metal-thiosemicarbazone complexes endowed with potent antiplasmodial and antiamoebic activities. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 18, p. 6857-6864, 2010.
- BANDOLI, J. et al. Mononuclear six-coordinated Ga(III) complexes: a comprehensive survey. *Coord. Chem. Rev.*, v. 253, p. 56-77, 2009.
- BARNHAMABC, K.J.; BUSHADE, A.I. Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chem.Soc. Rev.*, v. 43, p. 6727-6749, 2014.
- BASTOS, T.O. et al. Coordination to gallium(III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus* opportunistic fungi. *Microb. Research*, v. 165, p. 573-577, 2010.
- BATISTA, D.G.J. et al. Manganese(II) complexes with N4-methyl-4-nitrobenzaldehyde, N4-methyl-4-nitroacetofenone and N4-methyl-4-nitrobenzophenone thiosemicarbazone: Investigation of in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Polyhedron*, v. 29, p. 2232-2238, 2010

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; BARREIRO, E.J. Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 4, p. 131-142, 2007.

BERALDO, H. Cadernos temáticos de Química Nova na Escola 6 (2005) 4-6.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova*, v. 27, p. 461-471, 2004.

BERMEJO, E. et al. Spectral and structural studies of Zn and Cd complexes of 2-pyridineformamide N(4)-ethylthiosemicarbazone. *Polyhedron*, v. 23, p. 2303-2313, 2004.

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcelular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 303, n. 2, p.474-482, 1993.

BERTINI, I. et al. Biological Inorganic Chemistry.: structure and reactivity. *University Science Book*, 2007.

BRABEC, V; NOVAKOVA, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist. Updat*, v. 9, p. 111-122, 2006.

BRÁS, O.C.R. Vulnerabilidade e tuberculose no Rio de Janeiro. *Sáude e sociedade*, v. 23, p. 190-199, 2014.

BRUKER, APEX2, SAINT, SADABS. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2014.

CASTIÑEIRAS, A. et al. Supramolecular interactions in biologically relevant compounds. 2-Pyrazineformamide thiosemicarbazones and some products of their cyclization. *Journal Molecular Structure*, v. 1074, p. 1-18, 2014.

CHAN, J. et al. Synthesis and structural studies of gallium(III) and indium(III) complexes of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Inorg. Chim. Acta*, v. 363, p. 1140-1149, 2010.

CHITAMBAR, C.R. Gallium compounds as antineoplastic agents. *Curr. Opin. Oncol.*, v. 16, p. 547-552, 2004.

CHITAMBAR, C.R. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1863, p. 2044-2053, 2016.

CHITAMBAR, C.R. Medical applications and toxicities of gallium compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 7, p. 2337-2371, 2010.

CHOI, J. et al. Gallium nitrate ameliorates type II collagen-induced arthritis in mice. *Inter. Immun.*, v. 20, p. 269-275, 2014.

CLINICAL TRIALS, 2015. Disponível em <https://clinicaltrials.gov>. Acesso em 20 de maio de 2015.

COBO, F. Tuberculosis: the problem of multiresistance. *Imported Infectious Diseases*, p. 199-211, 2014.

COSTA, P. et al. *Substâncias carboniladas e seus derivados*, 1ª ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.

COTTON, F.A.; WILKINSON, G. *Advanced Inorganic Chemistry*. 3º ed. New York, 1988.

CRUZ-KNIGHT, W.; BLAKE-GUMBS, L. Tuberculosis: an overview. *Prim. Care*, v. 40, p. 743-756, 2013.

CRUZ, W.S. Síntese, caracterização e estudo teórico de bases de Schiff orto-substituídas e seus complexos de cobre(II) como potenciais agentes antitumorais. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2012.

CUNHA, S.; SILVA, T.L. One-pot and catalyst-free synthesis of thiosemicarbazones via multicomponent coupling reactions. *Tetrah. Let.*, v. 50, p. 2090-2093, 2009.

DALIMI, A. et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of aloe-emodin on *Leishmania major*. *J. Tradit. Compl. Medicine*, v. 5, p. 96-99, 2015.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Europ. J. Pharmacology*, v. 740, p. 364, 378, 2014.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat. Rev. Cancer*, v. 10, p. 728-733, 2010.

DE BOECK, M., KIRSCH-VOLDERS, M., LISON, D. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 533, p. 135-152, 2003.

DHEDA, K.; BARRY, C.R.; MAARTENS, G. Tuberculosis. *Lancet*, v. 387, p. 1211-1226, 2016.

DILOVIC, I. et al. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and proliferative activity. *Biorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 5189-5198, 2008.

DOLOMANOV, O. V. et al. Olex2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Cryst.*, v. 42, p. 339-341, 2009.

DONNICI, C.L. et al. Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Synthesis, biological characterization and structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, p. 5038-5043, 2009.

DUARTE, R. et al. Tuberculosis treatment and management of some problems related to the medication. *Revista Portuguesa Pneumologia*, v. 16, p. 559-572, 2010.

DYBOWSKI, C.; BAI, S.; BRAMER, S.B. Solid-state nuclear magnetic resonance. *Anal. Chem.*, v. 76, p. 3263-3267, 2004

ECHEVARRIA, E.M.; GIMENO, A.E. Manejo de la toxicidad por tuberculostáticos. Criterios de sustitución. *Medicine*, v. 10, n. 56, p. 3860-3864, 2010.

ENYEDY, E.A. et al. Interaction of the cancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and maltol with human serum proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.*, v. 20, p. 77-88, 2015.

FARREL, N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. *Coord. Chem. Rev.*, v. 232, p. 1-4, 2002.

FONSECA, A.S. et al. Síntese e caracterização estrutural do ligante isatina-3-(N4-benziltiossemicarbazona) e do seu complexo de mercúrio(II). *Quim. Nova*, v. 33, n. 7, p. 1453-1456, 2010.

FOSTIAK, L.M. et al. Structural and spectral characterization of transition metal complexes of 2-pyridineformamide N(4)-dimethylthiosemicarbazone, *Polyhedron*, v. 22, p. 83-92, 2003.

FOWLER, B.A. SEXTON, M.J. Gallium and gallium semiconductor compounds. *Hand. Toxicol. Metals*, p. 787-797, 2015.

FOWLER, B.A., SULLIVAN, D.W., SEXTON, M.J. Bismuth. *Hand. Toxicol. Metals*, p. 655-666, 2015.

FRANZBLAU, S.G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 362-366, 1998.

FREZZA, M. et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.*, v. 16, p. 1813-1825, 2010.

FYFE, C. A. Solid State NMR for Chemists, 1998

GE, R.; SUN, H. Bioinorganic chemistry of bismuth and antimony: target sites of metallodrugs. *Acc. Chem. Res.*, v. 40, p. 267-274, 2007

GEARY, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* v. 7, p. 81-122, 1971.

GENOVA, P. et al. Toxic effects of bis(thiosemicarbazone) compounds and its palladium(II) complexes on herpes simplex virus growth. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, v. 197, n. 2, p. 107-112, 2004.

GENTILE, J. M.; LOHMAN, P. H. M.; FERGUSON, L. R. Antimutagenesis / Anticarcinogenesis: mechanistic studies. *Mutat. Res.*, v. 480, p. 1-7, 2001.

GERHARDSSON, L.; KAZANTZIS, G. Diagnosis and treatment of metal poisoning: general aspects. *Handbook on the Toxicology metals*, v. 1, p. 487-505, 2015.

GOUVEIA, L.R. Complexos Metálicos de Fluorquinolonas: Síntese, Atividade Biológica e Estudos do Mecanismo de Ação. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Química. Belo Horizonte, 2013.

GRAY, H.: "Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century". *PNAS*, v. 100, p. 3563-3568, 2003.

GROSSET, J.H; SINGER, T. Streptomycin. *Reference Module Life Sciences*, 2ª Ed., p. 568-569, 2013.

GUERRA, W.; ALVES, F.E.; SILVA, K.C.C., Bismuto. *Quim. Nova Esc.*, v. 33, n. 3, p. 193-194, 2010.

GUHA, R. e al. Antimony resistant *Leishmania donovani* but not sensitive ones drives greater frequency of potent T-regulatory cells upon interaction with human PBMCs: role of IL-10 and TGF- β in early immune response. *PLOS. NEGL. TROP. DIS.*, V. 8, P. 1-11, 2014

GUO, Z. J.; SADLER, P. J. Metals in medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 38, n. 11, p. 513-1531, 1999.

INCA, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 09 de abril de 2016

ISMAIL, T. et al. Synthesis, characterization and preliminary in vitro cellular uptake studies of $^{67}\text{Ga(III)}$ thiosemicarbazones. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 33, p. 154-157, 2013.

ISPIR, E.; TOROGLU, S.; KAYRALDIZ, A. Syntheses, Characterization, Antimicrobial and Genotoxic Activities of New Schiff Bases and Their Complexes. *Transition Met. Chem.*, v. 33, p. 953-960, 2008

IUPAC- International Union Pure and applied chemistry. Disponível em: <www.iupac.org>. URL:<https://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2016.

JALILIAN, A.R. et al. Development of [^{103}Pd]-2-acetylpyridine 4N-methyl thiosemicarbazone complex for targeted therapy. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 268, p. 605-611, 2006.

JONES, C. J.; THORNBACK, J. R. *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*, 1ª ed., RSC: Cambridge, 2007.

JOSEPH, M. et al. Structural, antimicrobial and spectral studies of copper(II) complexes of 2-benzoylpyridine N(4)-phenyl thiosemicarbazone. *Polyhedron*, v. 25, p. 61-70, 2006.

JOUAD, M. et al. Synthesis, structural and spectral studies of 5-methyl 2-furaldehyde thiosemicarbazones and its Co, Ni, Cu and Cd complexes. *Polyhedron*, v. 20, p. 67-74, 2001.

KALUDEROVIC, G.N. et al. Ruthenium (II) p-cymene complex bearing 2,2'-dipyridylamine targets caspase 3 deficient MCF-7 breast cancer cells without disruption of antitumor immune response. *J. Inorg. Biochem.*, v. 153, p. 315-321, 2015.

KASUGA, N.C. et al. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of 6-coordinate antimony(III) complexes with tridentate 2-acetylpyridine thiosemicarbazone, bis(thiosemicarbazone) and semicarbazone ligands. *J. Inorg. Biochem.*, v. 100, p. 1176-1186, 2006.

KATZ, N.; COELHO, P.M.Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. *Acta tropica*, v. 108, p. 72-78, 2008.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, v. 7, p. 573-584, 2007.

KESEL, A.J. Broad-spectrum antiviral activity including human immunodeficiency and hepatitis C virus mediated by a novel retinoid thiosemicarbazone derivative. *Europ. J. Med. Chem.*, v. 46, p. 1656-1664, 2011.

KING, R. B. Encyclopedia of Inorganic Chemistry, vol. 1 e 8 John Wiley & Sons, NY, USA. 1ª edição, 1994.

KUMAR, K. et al. Highly potent anti-proliferative effects of a gallium(III) complex with 7-chloroquinoline thiosemicarbazone as a ligand: Synthesis, cytotoxic and antimalarial evaluation. *Europ. J. Med. Chem.*, v. 86, p. 81-86, 2014

LESSA, J.A. et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *Europ. J. Med. Chem.*, v. 45, p. 5671-5677, 2010.

LESSA, J.A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. *Polyhedron*, v. 30, p. 372-380, 2011.

LI, M. et al. A nine-coordinated bismuth(III) complex derived from pentadentate 2,6-diacetylpyridine bis(4N-methylthiosemicarbazone): crystal structure and both in vitro and in vivo biological evaluation. *Inorg. Chem.*, v. 51, p. 12521-12526, 2012.

LI, Y. et al. Synthesis, crystal structure and biological evaluation of main group seven-coordinated bismuth(III) complex with 2-acetylpyridine *N*⁴-phenylthiosemicarbazone. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, v. 23, p. 2288-2292, 2013.

LIMA, C.H.S.; BISPO, M.L.F.; DE SOUZA, M.V.N. Pirazinamida: um fármaco essencial no tratamento da tuberculose. *Revista Virtual Química*, v. 3, p. 159-180, 2011.

LIPPERT, B. Uses of metal compounds in medicine. *Mol. Sc. Chem. Eng.*, p. 1-6, 2014

LOBANA, T.S. et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals- an overview. *Coordination Chemistry reviews*, v. 253, p. 977-1055, 2009.

LOUGHEED, K.E.A. et al. New anti-tuberculosis agents amongst known drugs. *Tuberculosis*, v. 89, p. 364-370, 2009.

LYNCH, J.B. Multidrug-resistant tuberculosis. *Medical Clinics of North America*. v. 97, n. 4, p. 553-579, 2013.

MACHADO I. et al. Bioactivity of pyridine-2-thiolato-1-oxide metal complexes: Bi(III), Fe(III) and Ga(III) complexes as potent anti-Myco bacterium tuberculosis prospective agents. *European Journal Medicinal Chemistry*, v. 87, p. 267-273, 2014

MAHAJAN, K.; SWAMI, M.; SINGHR, V. Microwave synthesis, spectral studies, antimicrobial approach and coordination behavior of antimony(III) and bismuth(III) compounds with benzothiazoline. *Russian J. Coord. Chem.*, v.35, p. 179-185, 2009.

MARTINS, D.A. et al. Copper(II)-fluoroquinolones complexes with anti-Trypanossoma cruzi activity and DNA binding ability. *Biometals*, v.25, n.5, p. 951-960, 2012.

MEHRING, M. From molecules to bismuth oxide-based materials: potential homo- and heterometallic precursors and model compounds. *Coord. Chem. Rev.* v. 251, p. 974-1006, 2007.

MELLENDEZ, E. Titanium complexes in cancer treatment. *Crit. Rev. Onc./Hem.*, v. 42, p. 309-315, 2002.

MELNIKOV, P.; MALZAC, A.; COELHO, M. B. Gallium and bone pathology. *Acta Ortop. Bras.*, v. 16, p. 54-57, 2008.

MENDES, I.C. et al. Gallium(III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma. *European Journal Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 1870-1877, 2009.

MESSLER, G.L, TARR, D.A., Inorganic Chemistry, 4ª edição, 2010.

MOGHADAM, F.H. et al. Preparation and biodistribution studies of [⁶⁷Ga]2-acetylpyridine 4,4-dimethyl thiosemicarbazone complex as a possible SPECT tracer for detection of malignancies. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 272, p. 115-121, 2007.

MOHAMMADZADEH, M.; BEHNAZ, F; GOLSHAN, Z. Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran. *J. Infect. Public Health.*, v. 6, p. 120-124, 2013

MORENO-RODRIGUEZ, A. et al. In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of Trypanossoma cruzi. *Europ. J. Med. Chem.*, v. 87, p. 23-29, 2014).

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p 55-63, 1983.

MOURA, F.J.D. et al. Pentoxifylline prevents the meglumine antimonite-induced toxicity in rats, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride. *Toxicology*, v. 243, p. 66-74, 2008.

MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current Opin. Chem. Biol.*, v. 19, p. 144-153, 2014.

MUTHU, S. et al. Synthesis, structure, spectroscopic studies (FT-IR, FT-Raman and UV), normal coordinate, NBO and NLO analysis of salicylaldehyde *p*-chlorophenylthiosemicarbazone. v. 1081, p. 400-412, 2015

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. 4ª ed. p. 1-484, 1986.

NEVES, A.P.; VARGAS, M.D. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. *Rev. Virtual Quim.* v. 3, p. 196-209, 2011.

NIMMO, C. et al., Shortening treatment of tuberculosis: lessons from florquinolone trials. *The Lancet Infect. Diseases.*, v. 15, p. 141-143, 2015.

NUSSBAUM, R.L.; MCINEES, R.R.; WILLARD, H.F. *Genética Médica*. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 525 p.

OLANO, C.; MENDEZ, C.; SALAS, J.A. Antitumour compounds from marine actinomycetes. *Marine Drugs*, v. 7, p. 210-248, 2009.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: Introduction. *Chem. Rev.*, v. 99, n. 9, p. 2201-2203, 1999.

OZTURK, I.I. et al. Synthesis, characterization and biological activity of antimony(III) or bismuth(III) chloride complexes with dithiocarbamate ligands derived from thiuram degradation. *Polyhedron*, v. 67, p. 89-103, 2014.

PAVAN, F.R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti- Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity, *Europ.Journ. Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 1898-1905, 2010.

PAVIA, D.L. et al. Introdução a espectroscopia. 4ª ed., Cengage Learning, São Paulo, 2010.

PARRILHA, G.L. et al. 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes exhibit high anti-trypanosomal activity. *Polyhedron*, v. 31, p. 614-621, 2012.

PIZARRO, A.M.; BARRY, N.P.E.; SADLER, P.J. Metal-DNA coordination complexes. *Reference Module in Chemistry*, v. 3, p. 751-784, 2013

PRADO Jr, J.C.; VIRGILIO, T.C.; MEDRONHO, R.A. Comparação da proporção de cura por tuberculose segundo cobertura e tempo de implantação de saúde da família e fatores socioeconômicos e demográficos no município do Rio de Janeiro, Brasil, em 2012. *Ciência Saúde Coletiva*, v. 21, p. 1491-1498, 2016

QIN, Y. et al. Novel thiosemicarbazone chitosan derivatives: preparation, characterization and antifungal activity. *Carboh. Poly.*, v. 87, p. 2664-2670, 2012.

RAHMAN, M.D. et al. Inhibition of endonuclease cleavage and DNA replication of E. coli plasmid by the antitumor rhodium(II) complex. *Arch. Bioch. Bioph.*, v. 464, p. 28-35, 2007.

REBOLLEDO, A.P. et al. Palladium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: spectral characterization, structural studies and cytotoxic activity. *J. Inorg. Chem.*, v. 99, p. 698-706, 2005.

REBOLLEDO, A.P. et al. Tin(IV) complexes of 2-benzoylpyridine N(4)-phenyl-thiosemicarbazone: spectral, characterization, structural studies and antifungal activity. *Appl. Organomet. Chem.*, v. 17, p. 945-951, 2003

REICHERT, D. E.; LEWIS, J. S.; ANDERSON, C. J. Metal complexes as diagnostic tools. *Coord. Chem. Rev.*, v. 184, p. 3-66, 1999.

REIS, D.C. et al. Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines. *Europ. J. Med. Chem.*, v. 45, p. 3904-3910, 2010.

REIS, M. Farmacocinética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. *Simpósio de Farmacogenética*. v. 39, p. 577-586, 2006.

REIS, R.S. et al. Comparison of flow cytometric and Alamar Blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 2247-2248, 2004.

REZAEIVALA, M.; KEYPOUR H. Schiff base and non-Schiff base macrocyclic ligands and complexes incorporating the pyridine moiety- the first 50 years. *Coord. Chem. Rev.*, v. 280, p. 203-253, 2014.

RIBEIRO, E.B.V.; BENITE, A.M.C.; SOARES, M.H.F.B. Uma revisão conceitual de metais como suporte para seu ensino. *Revista Ibero-americana de educação*, v. 55, p. 1-10, 2011.

RIDER, B.J. Mechlorethamine. *Reference Module in Biomedical Sciences*, p. 1-4, 2007

RIEDER, P. The physician Louis Odier and the medical market in Geneva(1774-1817). *Gesnerus*, v. 69, p. 54-75, 2012.

RIOBÓ, R.R. *Complejos metálicos com tiosemicarbazonas derivadas de la 2-pirazinaformamida*. 2007. 786 f. Tese (Doutorado em Química Inorgânica), Universidade Santiago de Compostela, Espanha, 2007

ROCHA, D.P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quim. Nova*, v. 34, p. 111-118, 2011.

RODRIGUES, M.A.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Compostos inorgânicos como fármacos. *Bol. Socied. Port. Quim.*, v. 115, p.25-30, 2009.

ROMERO-CANELON I.; SADLER P.J. Next-generation metal anticancer complexes: multitargeting via redox modulation. *Inorg. Chem.*, v. 52, p. 12276-12291, 2013.

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev. Saúde Pública*, v. 36, p. 525-532, 2002.

TENÓRIO, R.P. et al. Thiosemicarbazones: preparation methods, synthetic applications and biological importance. *Quim. Nova*, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

SAAD, E.M. et al. Studies on bismuth(III) complexes of ligands containing nitrogen/sulfur and extractive procedure for determination of Bi(III). *Transition Metal Chemistry*, v. 32, p. 155-162, 2007.

SCOTT, A.M.; WOLCHOK, J.D., OLD, L.J. Antibody therapy of câncer, *Nature review cancer*. v. 12, p. 278-287, 2012.

SESSLER, J. L. et al. *Medicinal inorganic chemistry*. American Chemical Society Symposium. Series: Washington, DC, 2005.

SHAKIR, M. et al. Synthesis, Spectroscopic and Electrochemical Studies of N,N-bis[(E)-2-thienylmethylidene]-1,8-naphthalenediamine and its Cu(II) Complex: DNA Cleavage and Generation of Superoxide Anion. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 104, p. 449-456, 2011

SHAW, C.F. Gold-based Therapeutic Agents, *Chem. Rev*, v. 99, p. 2589-2600, 1999.

SHELDRIK, G. M.; *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, v. 64, p.112,2008

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P. W. Química inorgânica, 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2003.

SILVA, A.P. et al. Antitumor activity of (-)-alpha-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines, v. 45, p. 2987-2993, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Spectrometric identification of organic compounds. 7^a ed., p. 1-493, 2005.

SINGH, R. et al. Heavy metals and living systems: an overview. *Indian J. Pharmacol.*, v. 43, p. 246-253, 2011.

SRIRAM, D. et al. Discovery of new antitubercular oxazolyl thiosemicarbazones. *J. Med.Chem.*, v. 49, p. 3448-3450, 2006

STRAUS, D.J. Gallium nitrate in the treatment of lymphoma. *Semin. Oncol.* v. 30, n. 5, p. 25-33, 2003.

TARASCONI, P. Synthesis, spectroscopic characterization and biological properties of new natural aldehydes thiosemicarbazones. *Bioorganic medicinal chemistry*, v. 8, p. 157-162, 2000.

TELLA, M., POKROVSKI, G.S. Antimony(III) complexing with O-bearing organic ligands in aqueous solution: An X-ray absorption fine structure spectroscopy and solubility study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 73, p. 268-290, 2009.

TENÓRIO, R.P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Quím. Nova*, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

TRUDU, F. et al. Coordination compounds in cancer: past, present and perspectives. *J. Applied Biom.*, v. 13, p. 79-103, 2015.

TYLENDÁ, C.A.; FOWLER, B.A. Antimony. *Handbook Toxicology Metals*, 3^a ed., p. 353-365, 2007.

TISHMACK, P.A.; BUGAY, D.E.; BYRN, S.R. Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.*, v. 92, p. 441-474, 2003.

UENO, T. et al. Crystal structures of artificial metalloenzymes by insertion of chromium Schiff base complexes into apomyoglobin mutants. *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, v. 43, p. 2852-2858, 2004.

URTIAGA, M.K. et al. Diazidobis(2,2'-bipyridine)nickel(II) monohydrate. *Acta Cryst.*, C51, p. 62-65, 1995.

VANITHA, J.D.; PARAMASIVAN, C.N. Evaluation of microplate Alamar blue assay for drug susceptibility testing of Mycobacterium avium complex isolates. *Microbiol. Infect. Dis.*, v. 49, p. 179-182, 2004.

VARDANYAN, R.; HRUBY, V. Antineoplastic agents. *Synthesis of best-seller drugs*, p. 495-547, 2016.

VELOSO, D.P.; MENEZES, S.M.C. Parâmetros e Símbolos a serem utilizados em Ressonância Magnética Nuclear. *Química Nova*. v.22, p.622-629, 1999.

VERRON, E.; BOULER, J.M.; SCIMECA, J.C. Gallium as a potential candidate for treatment of osteoporosis. *Drug Discovery Today*, v. 17, p. 1127-1132, 2012.

XIAO, Y. et al. L-glutamine Schiff Base Copper Complex as a Proteasome Inhibitor and an Apoptosis Inducer in Human Cancer Cells. *International Journal of Oncology*, v. 33, p. 1073-1079, 2008

ZAHEER, M. et al. Synthesis, Characterization, Electrochemistry and Evaluation of Biological Activities of Some Ferrocenyl Schiff Bases. *Appl. Organometal. Chem.*, n. 25, p. 61-69, 2011

ZHANG Y. et al. Lead, Mercury and arsenic poisoning due to topical use of traditional chinese medicines. *The American J. Med.*, v. 126, p. 451-454, 2013.

ZHANG, Z. et al. Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for chemoimmunotherapy. *Cancer Letters*, v. 369, p. 331-335, 2015

ZHU L. et al. Inhibitory mechanisms of heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones for two forms of human ribonucleotide reductase. *Bioch. Phar.*, v.78, n. 9, p. 1178-1185, 2009.

ZUCKER, D. et al. Characterization of PEGylated nanoliposomes co-remotely loaded with topotecan and vincristine: relating structure and pharmacokinetics to therapeutic efficacy. *J. Control. Release*, v.160, p. 281-289, 2012.

WILSON, P.F.; McEWAN, M.J.; MEOT-NER, J. *Spectrom.*, v. 132, p. 149-152, 1994.

WEST, D.X.; PADHYE, S.B.; SONAWANE, P.B. *Struc. Bonding (Berlin)*, v. 76, p. 1, 1991.

WHO- World Health Organization, 2013. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf. Acesso em: 24 de fevereiro de 2014.

WHO- World Health Organization, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>. Acesso em: 24 de junho de 2016.

YANG, M.; KROFT, S.H.; CHITAMBAR, C.R. Gene expression analysis of gallium-resistant and gallium-sensitive lymphoma cells reveals a role for metal-responsive transcription factor-1, metallothionein-2A, and zinc transporter-1 in modulating the antineoplastic activity of gallium nitrate. *Mol. Cancer Ther.*, v. 6, p. 633-643, 2007

YANG, N., SUN, H. Biocoordination chemistry of bismuth: recent advances. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 251, p. 2354-2366, 2007.

YU, H et al. Colorimetric and fluorescence “turn-on” recognition of fluoride by a maleonitrile-based uranyl salen-complex. *Dyes Pigments*, v. 135, p. 94-101, 2016.

YU, Y. et al. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. *J. Med. Chem.*, v. 52, n. 17, p. 5271-5294, 2009.

APÊNDICE A – Espectros vibracionais

Figura 1 – Espectro no IR (KBr) do composto (1)

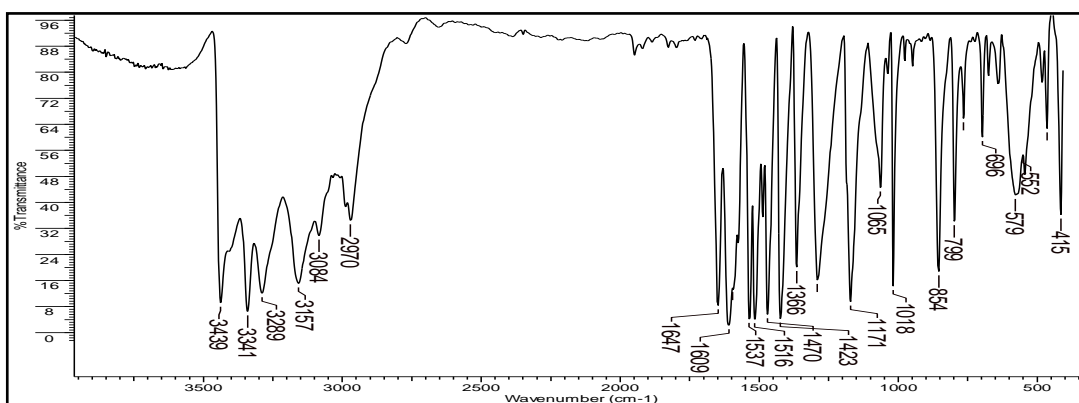


Figura 2 – Espectro no IR (KBr) do composto (2)

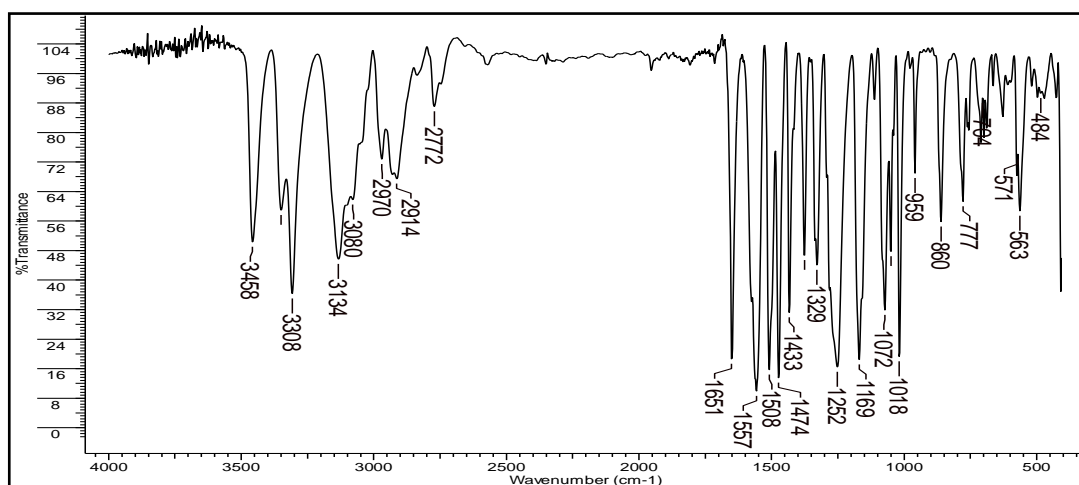


Figura 3 – Espectro no IR (KBr) do composto (3)

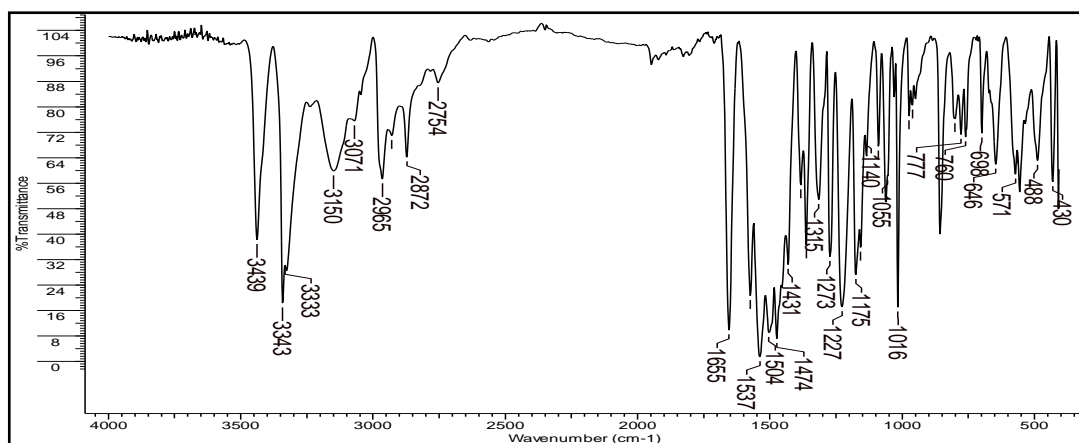


Figura 4 – Espectro no IR (KBr) do composto (4)

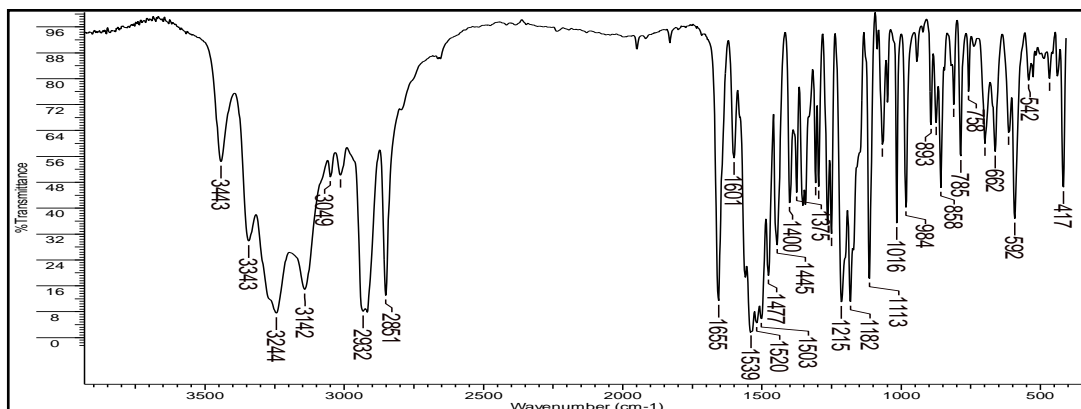


Figura 5 – Espectro no IR (KBr) do composto (5)

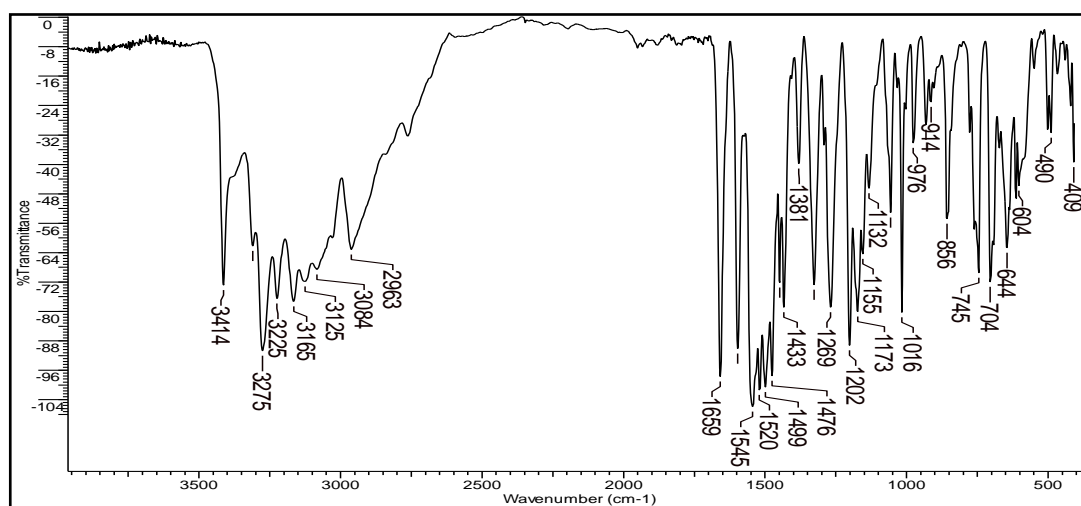


Figura 6 – Espectro no IR (KBr) do produto (6)

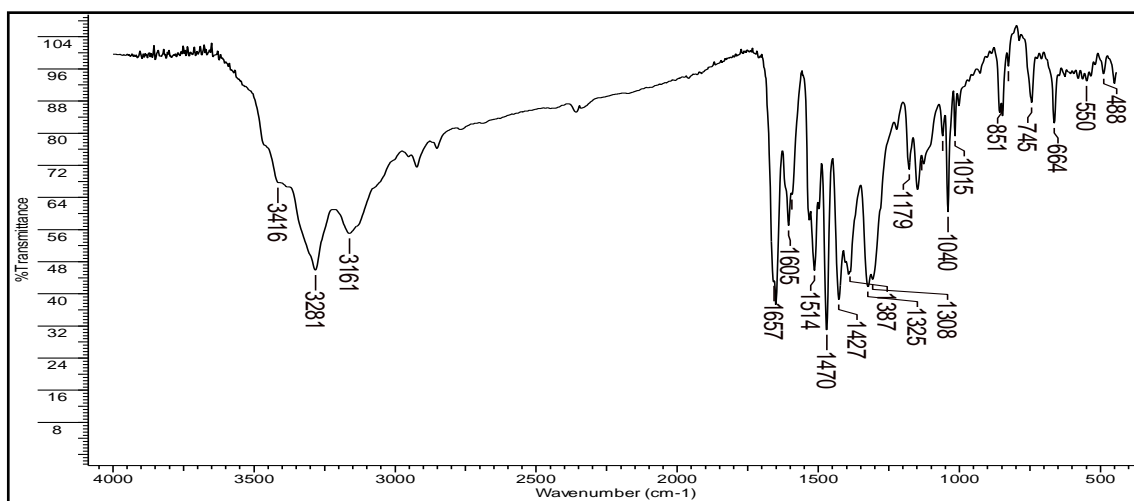


Figura 7 – Espectro no IR (KBr) do complexo (7)

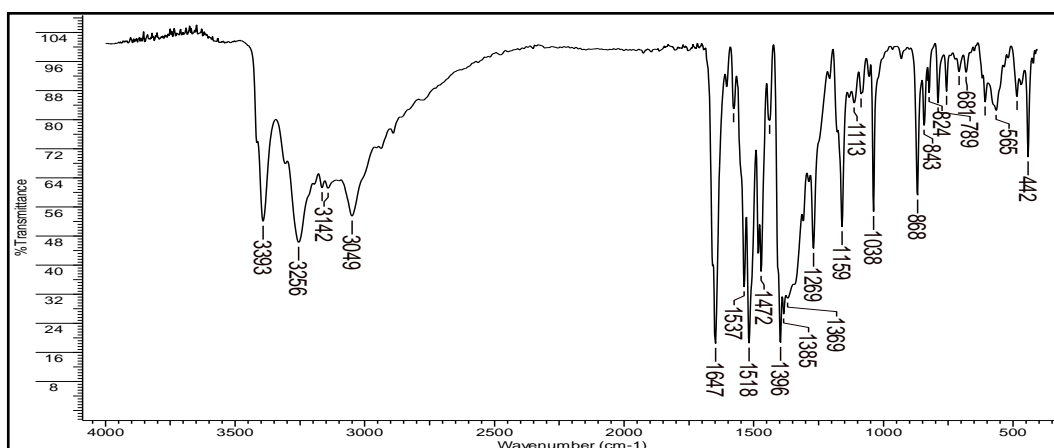


Figura 8 – Espectro no IR (KBr) do complexo (8)

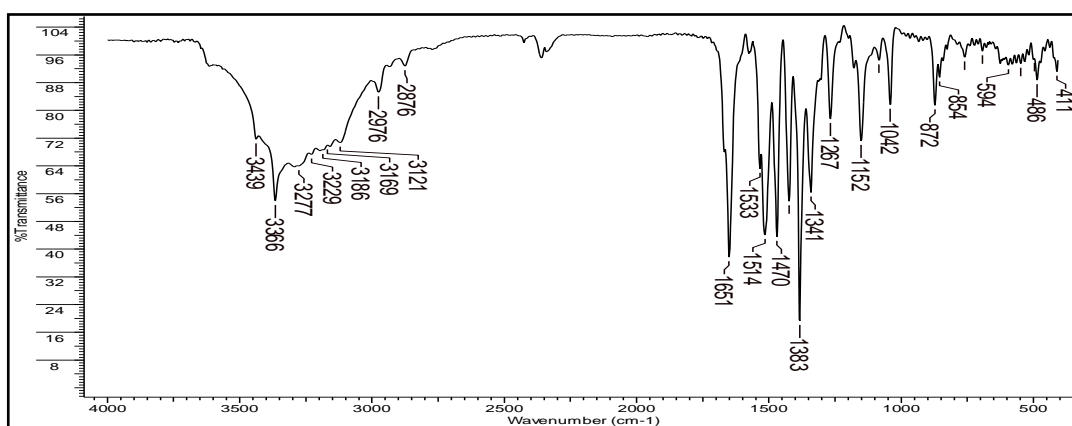


Figura 9 – Espectro no IR (KBr) do complexo (9)

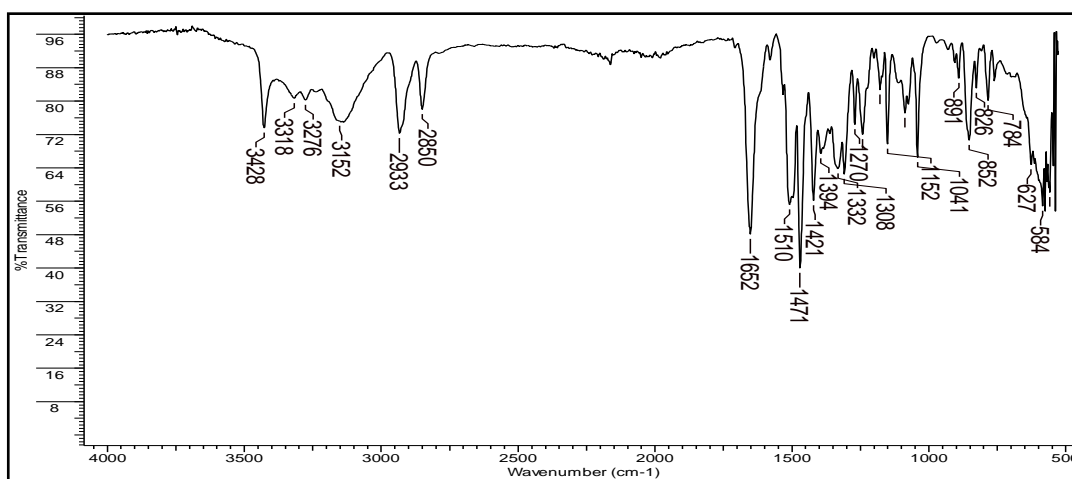


Figura 10 – Espectro no IR (KBr) do complexo (10)

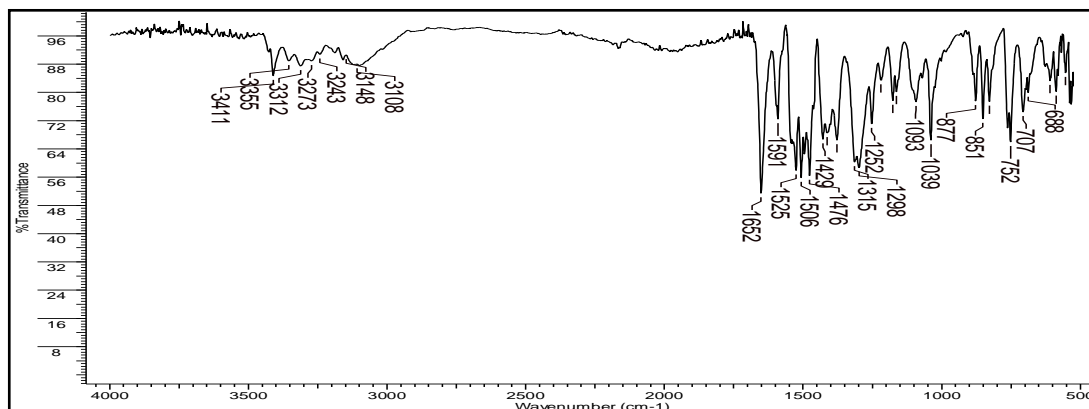


Figura 11 – Espectro no IR (KBr) do complexo (11)

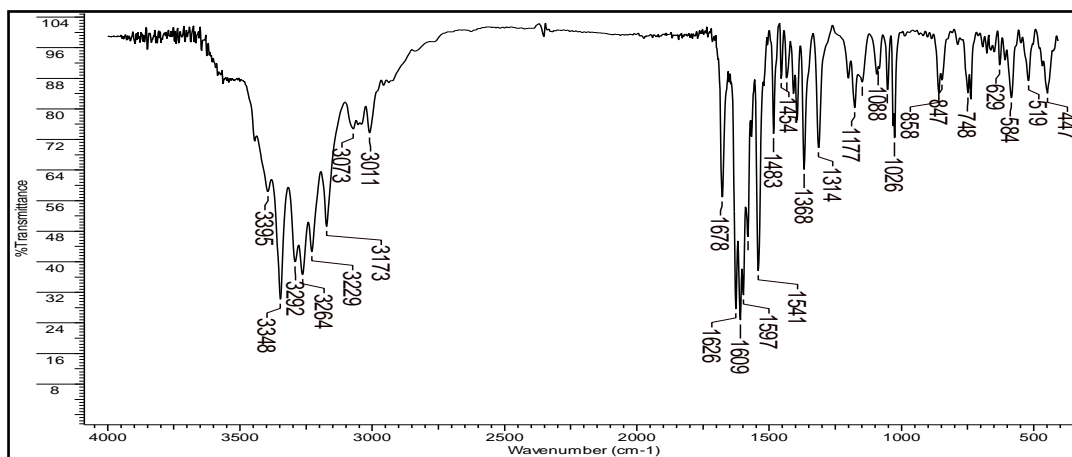


Figura 12 – Espectro no IR (KBr) do complexo (12)

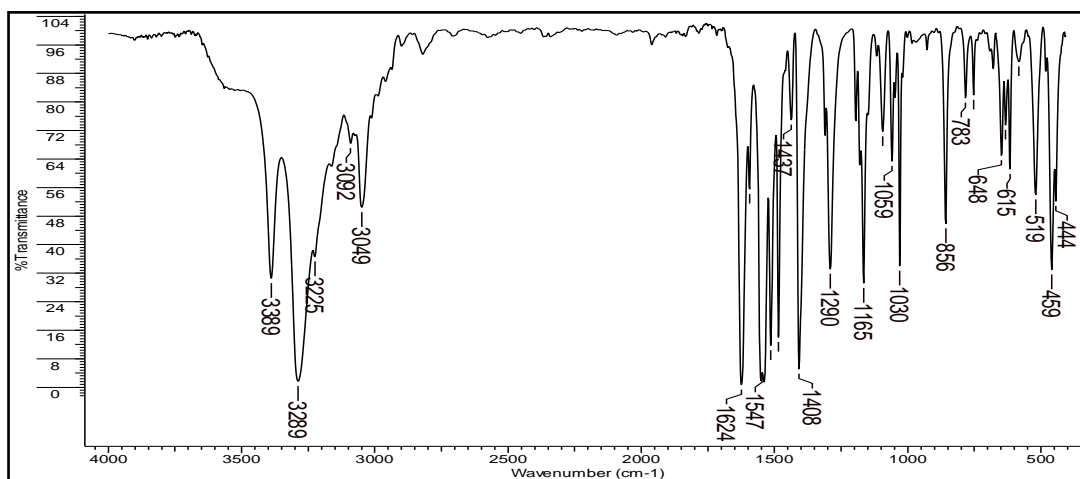


Figura 13 – Espectro no IR (KBr) do complexo (13)

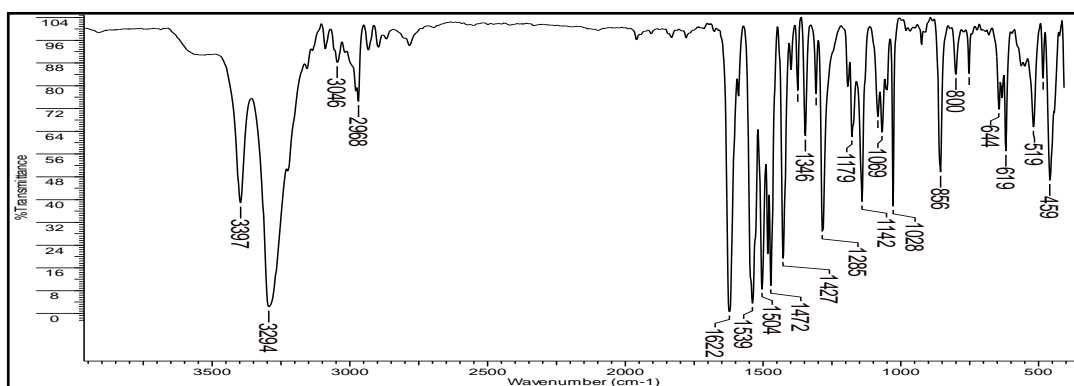


Figura 14 – Espectro no IR (KBr) do complexo (14)

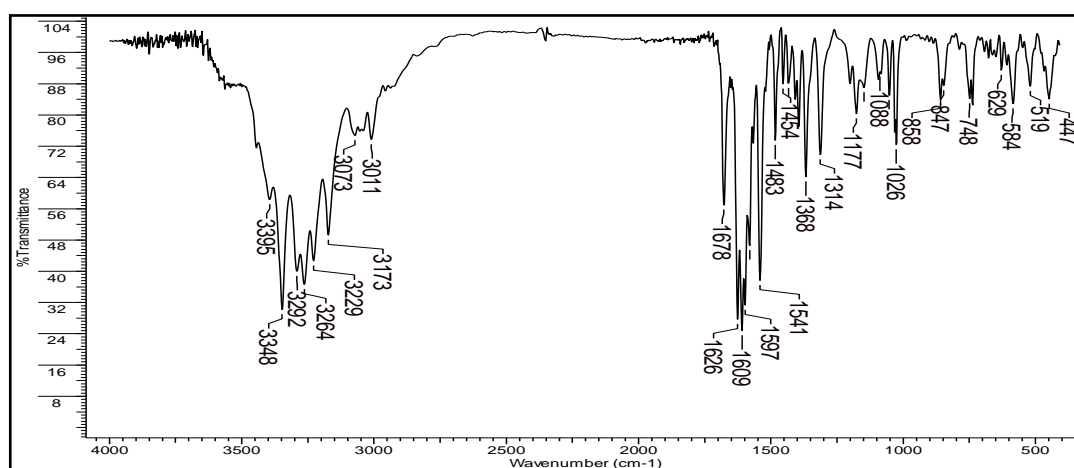


Figura 15 – Espectro no IR (KBr) do complexo (15)

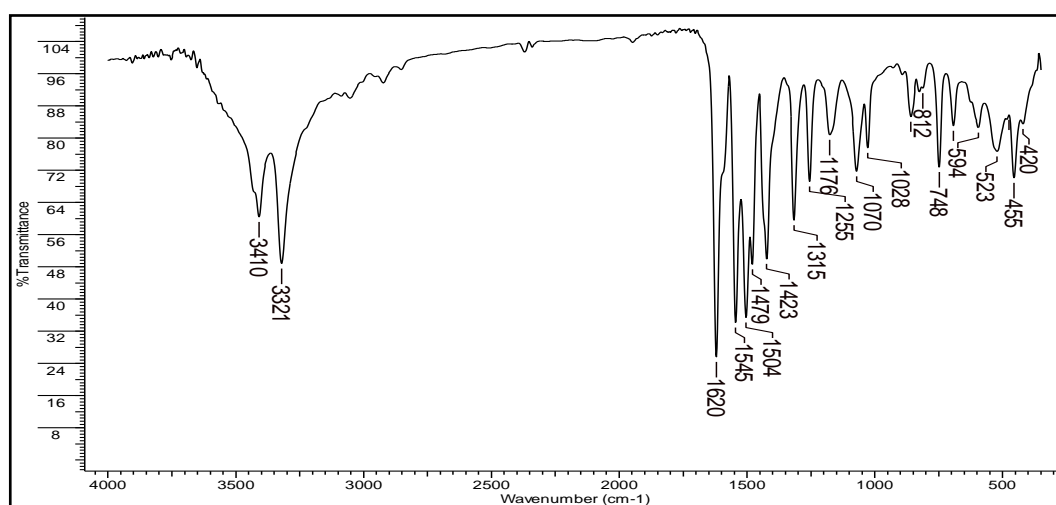


Figura 16 – Espectro no IR (KBr) do complexo (16)

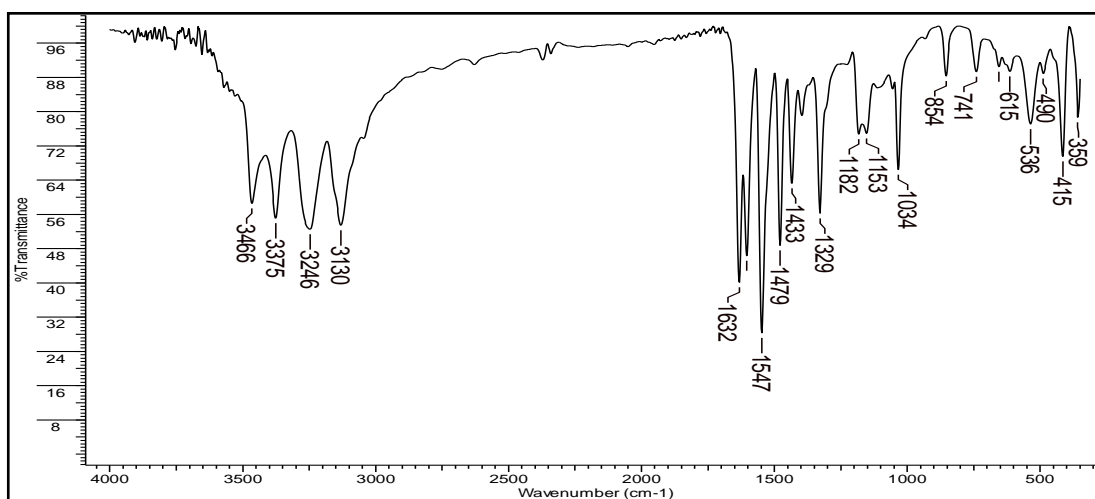


Figura 17 – Espectro no IR (KBr) do complexo (17)

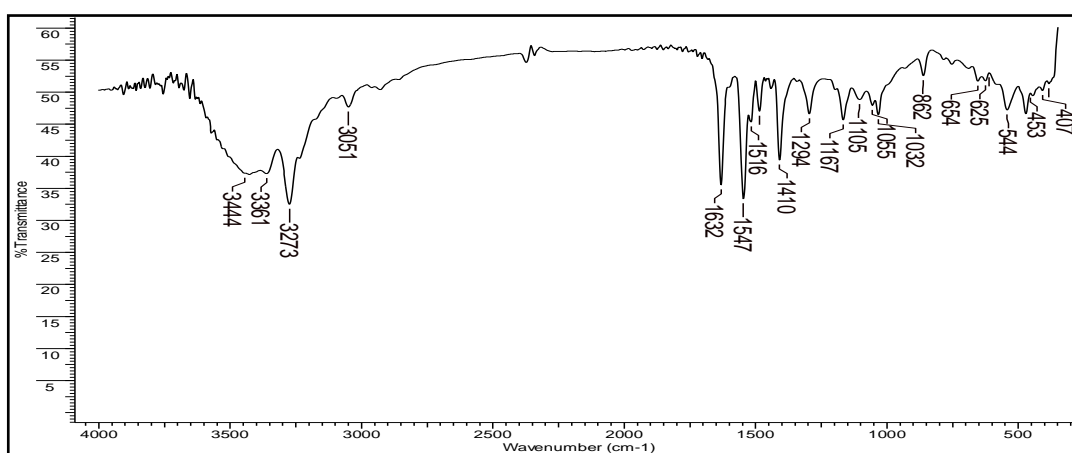


Figura 18 – Espectro no IR (KBr) do complexo (18)

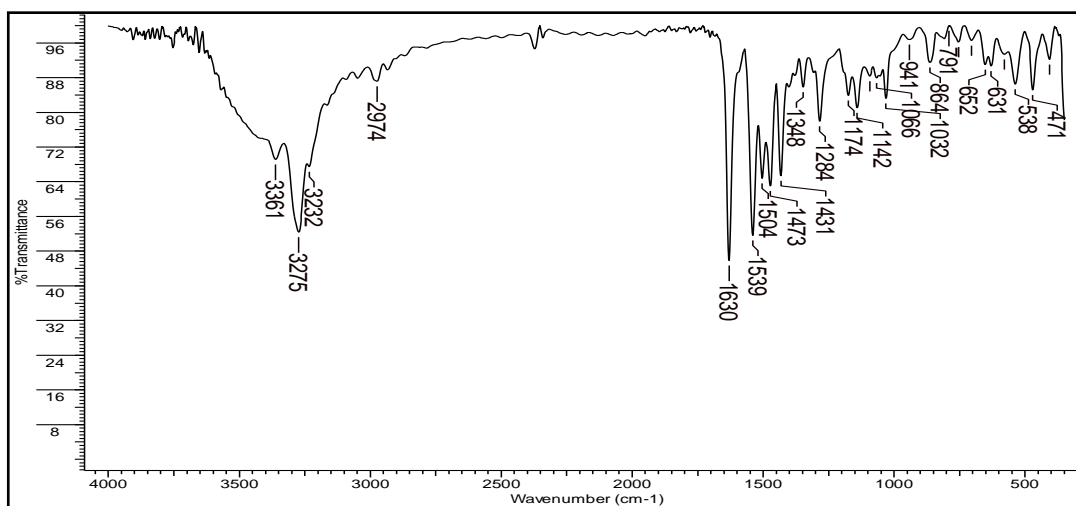


Figura 19 – Espectro no IR (KBr) do complexo (19)

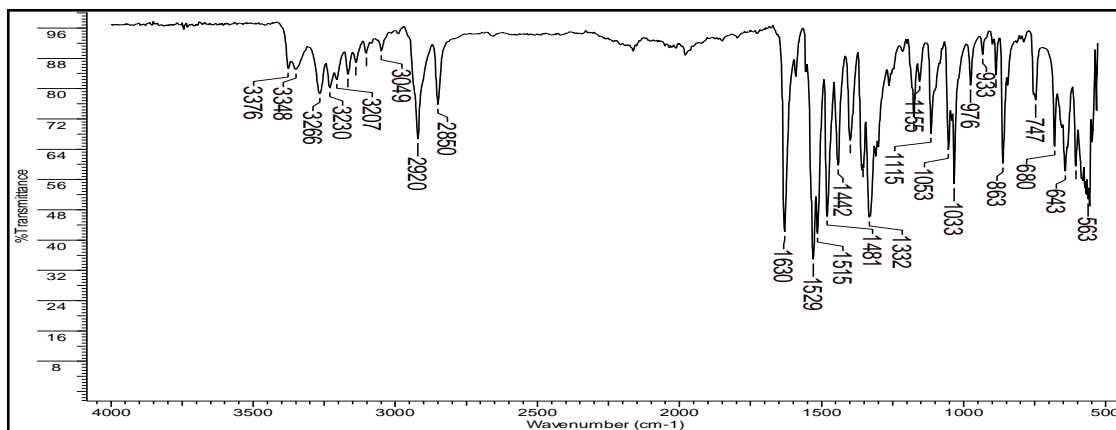


Figura 20 – Espectro no IR (KBr) do complexo (20)

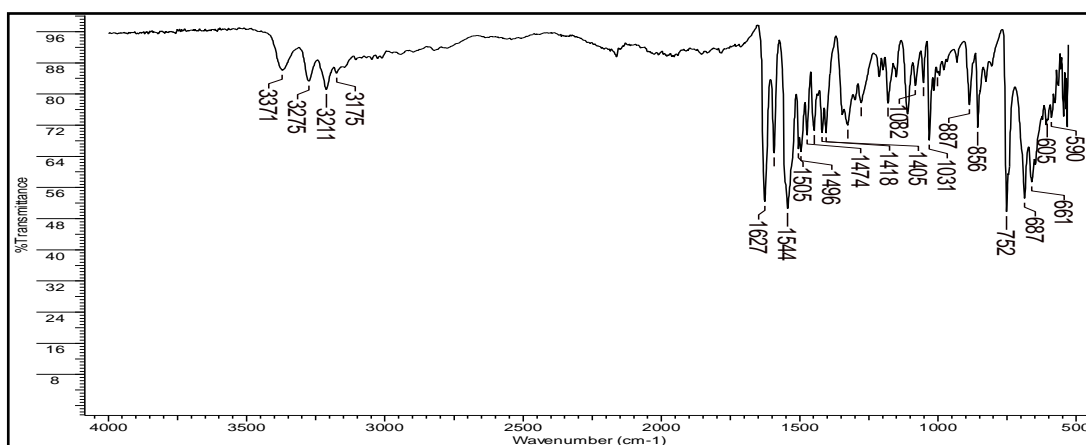


Figura 21 – Espectro no IR (KBr) do composto (21)

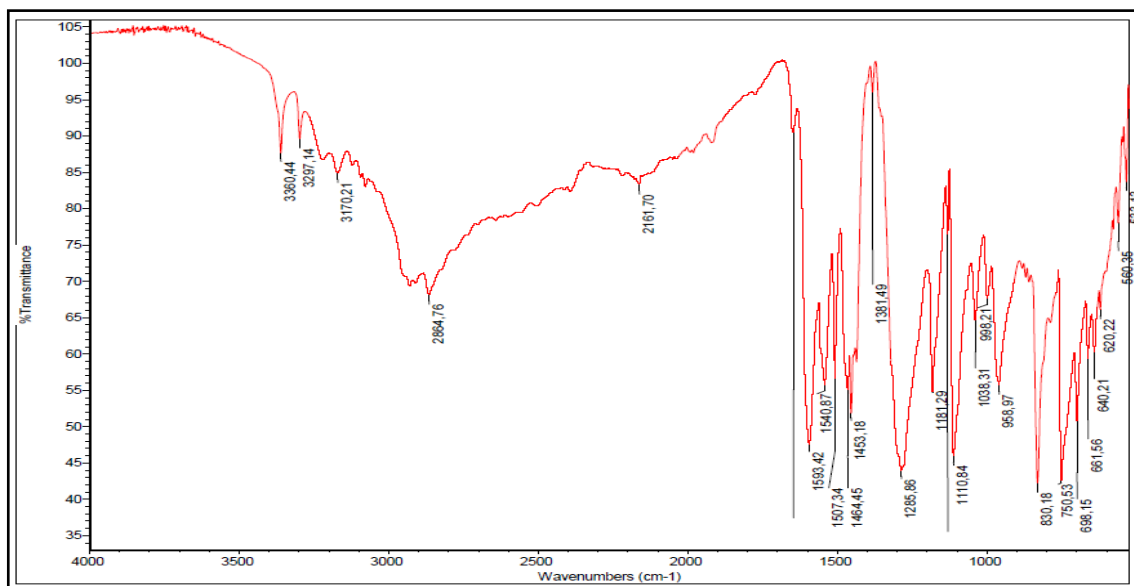


Figura 22 – Espectro no IR (KBr) do composto (22)

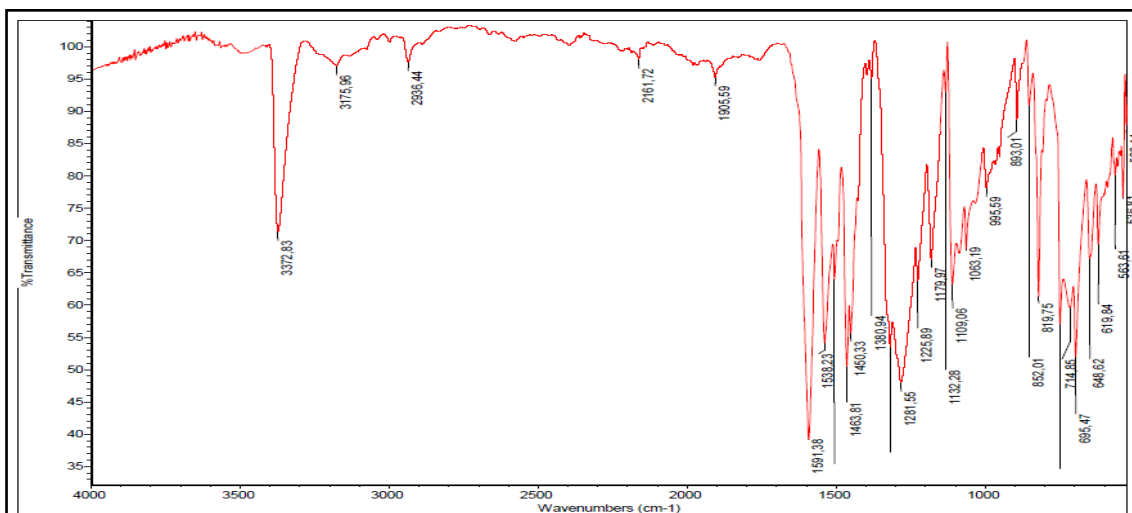


Figura 23 – Espectro no IR (KBr) do composto (23)

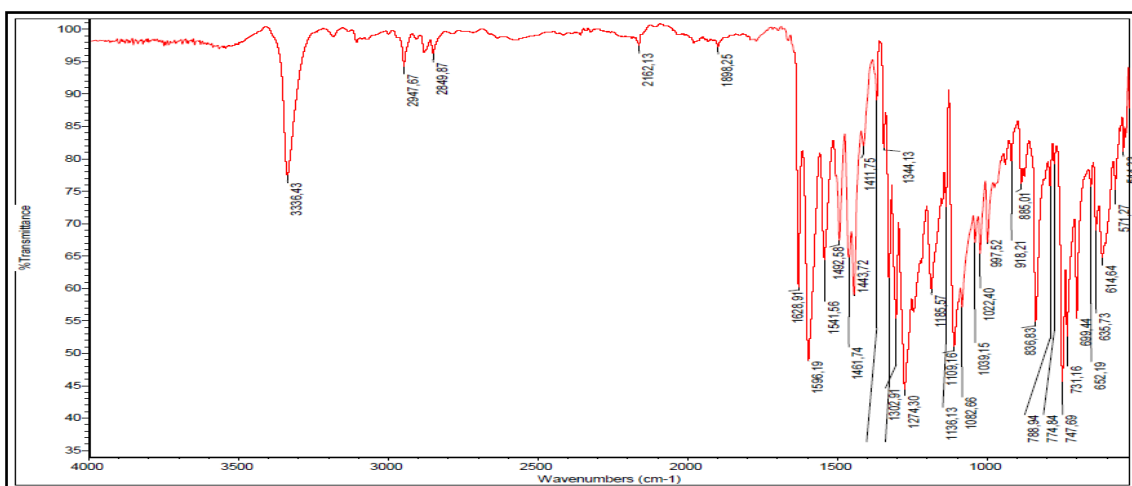


Figura 24 – Espectro no IR (KBr) do composto (24)

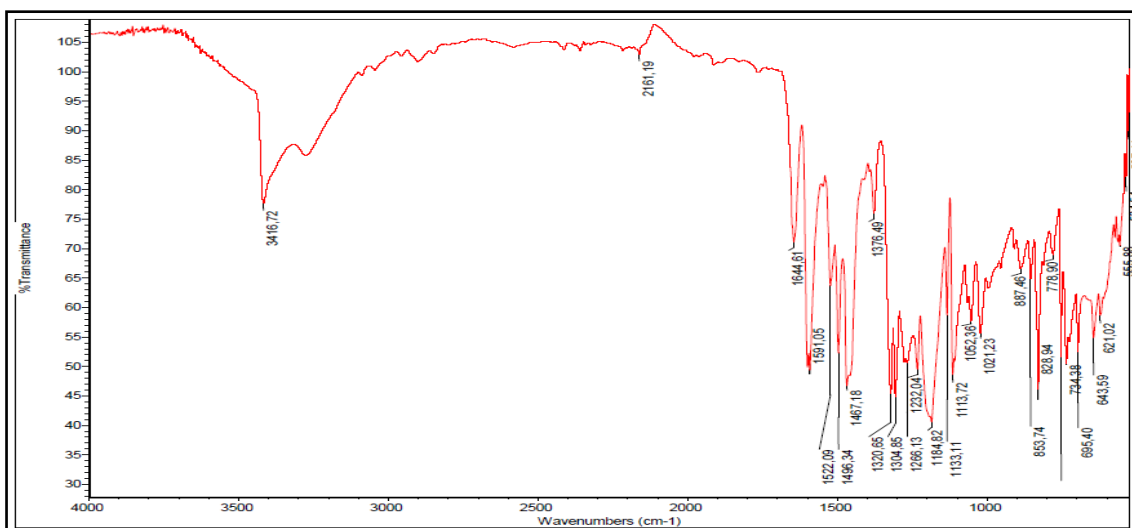


Figura 25 – Espectro no IR (KBr) do composto (25)

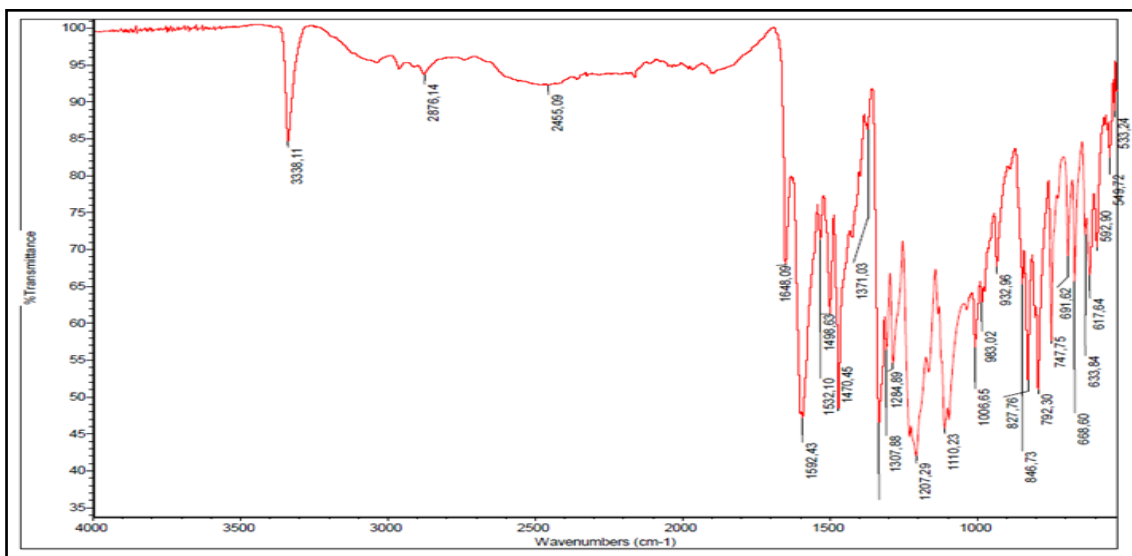


Figura 26 – Espectro no IR (KBr) do composto (26)

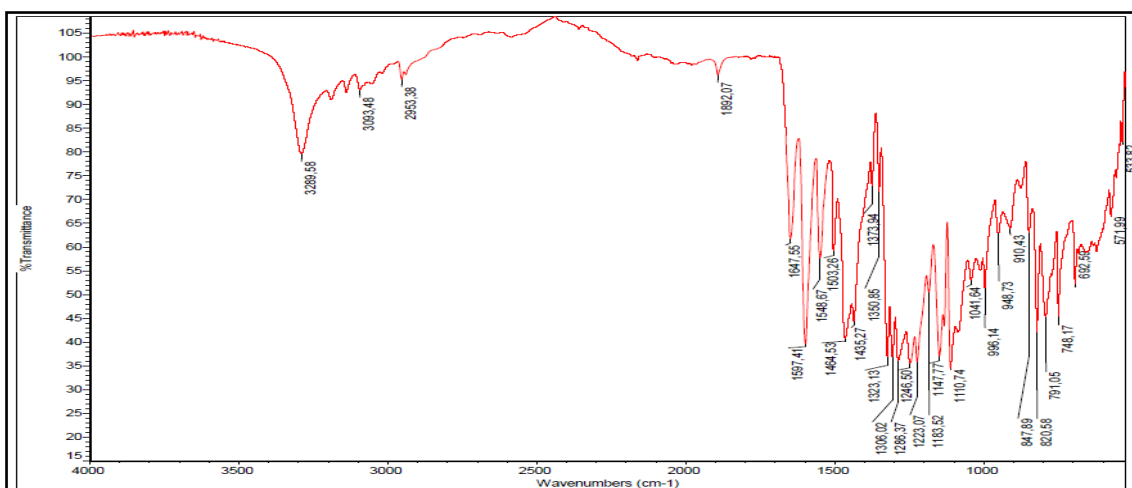


Figura 27 – Espectro no IR (KBr) do composto (27)

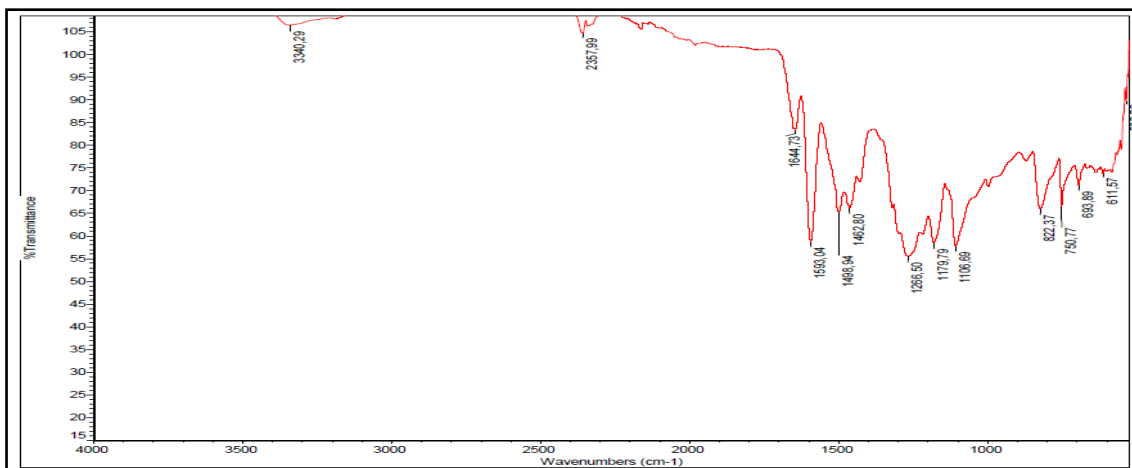


Figura 28 – Espectro no IR (KBr) do composto (28)

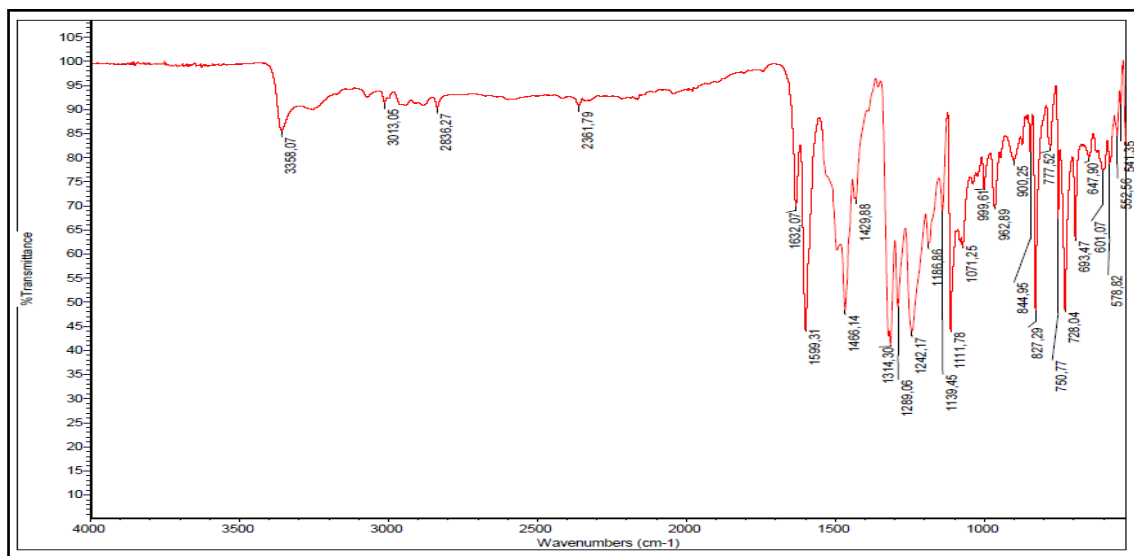


Figura 29 – Espectro – IR (KBr) do composto (29)

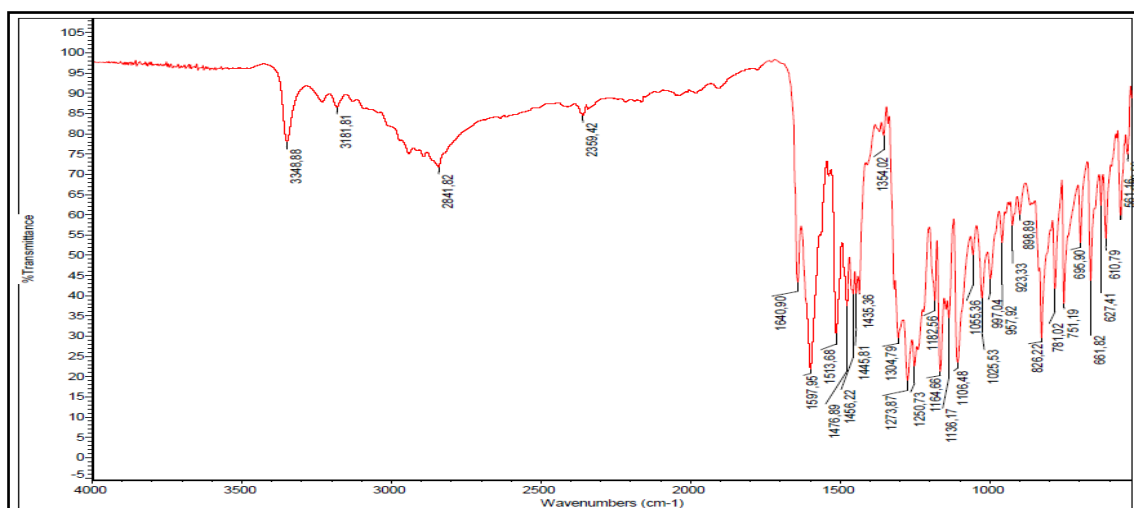


Figura 30 – Espectro no IR (KBr) do composto (30)

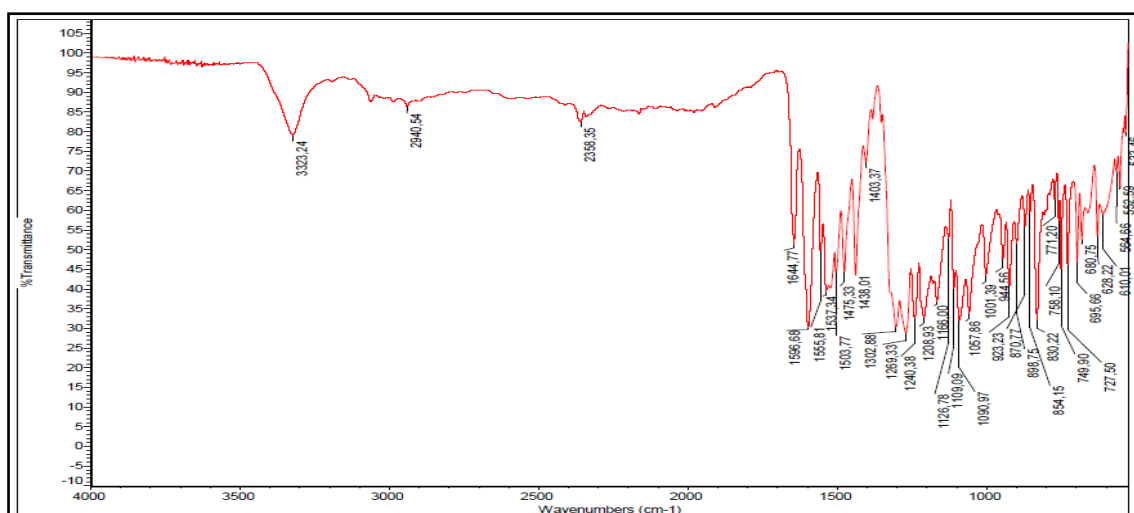


Figura 31 – Espectro no IR (KBr) do composto (31)

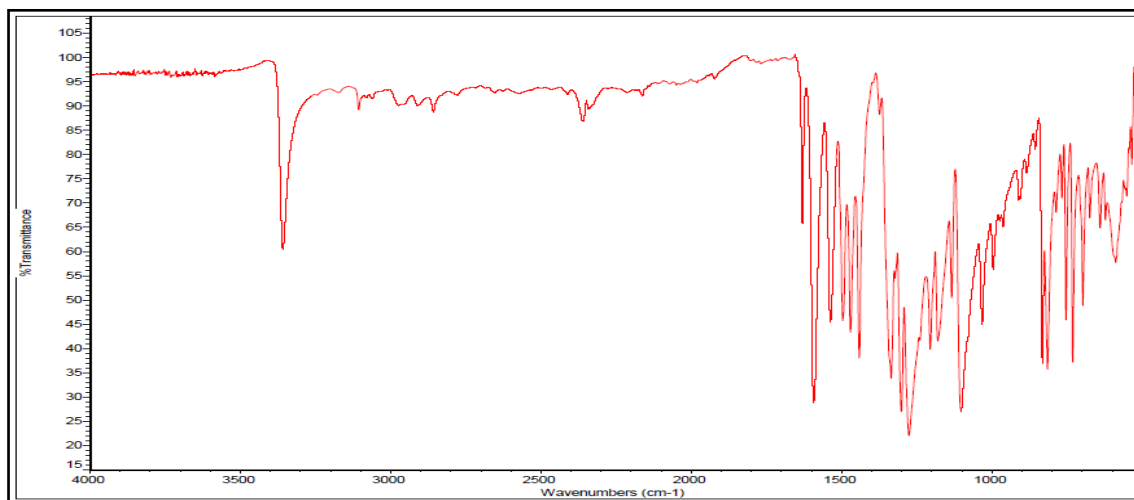
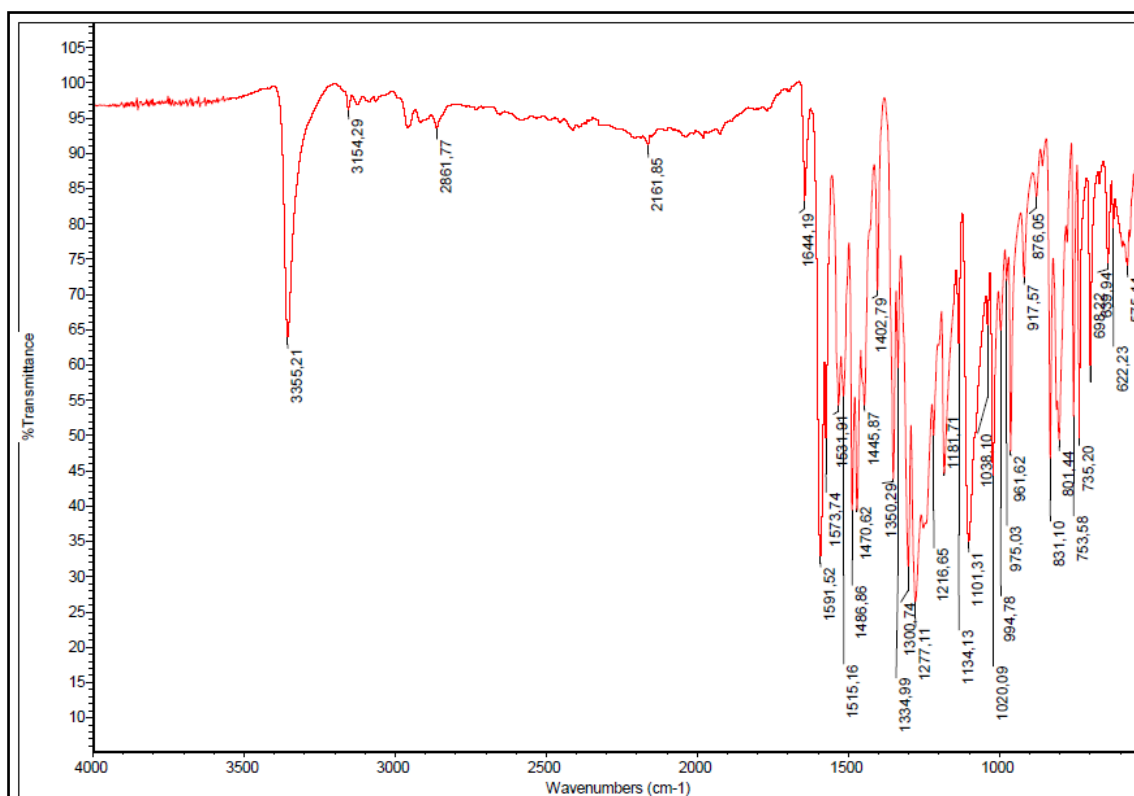


Figura 32 – Espectro no IR (KBr) do composto (32)



APENDICE B – Espectros Eletrônicos

Figura 33 – Espectro eletrônico de (1) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

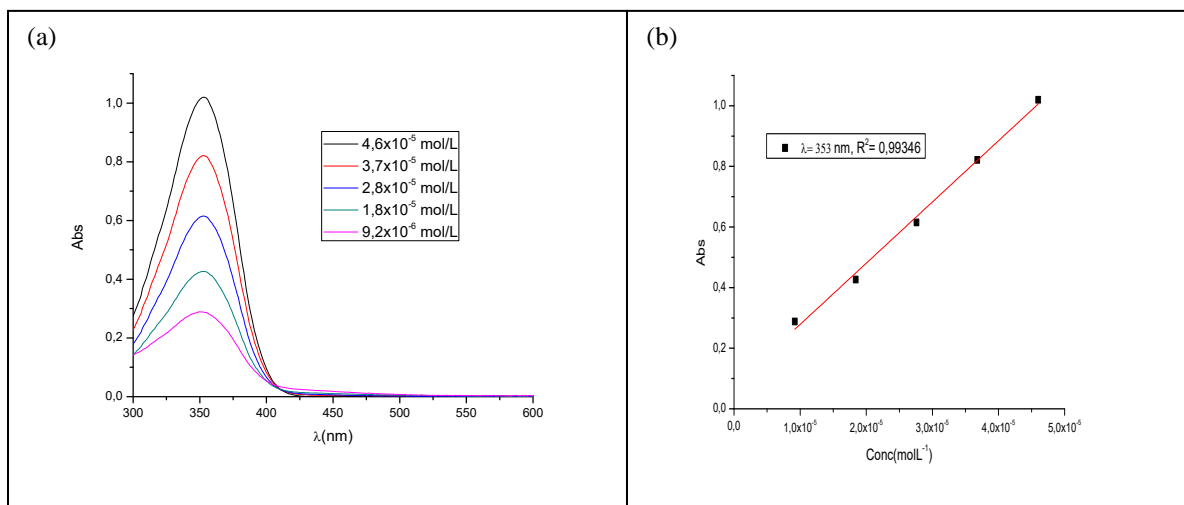


Figura 34 – Espectro eletrônico de (2) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

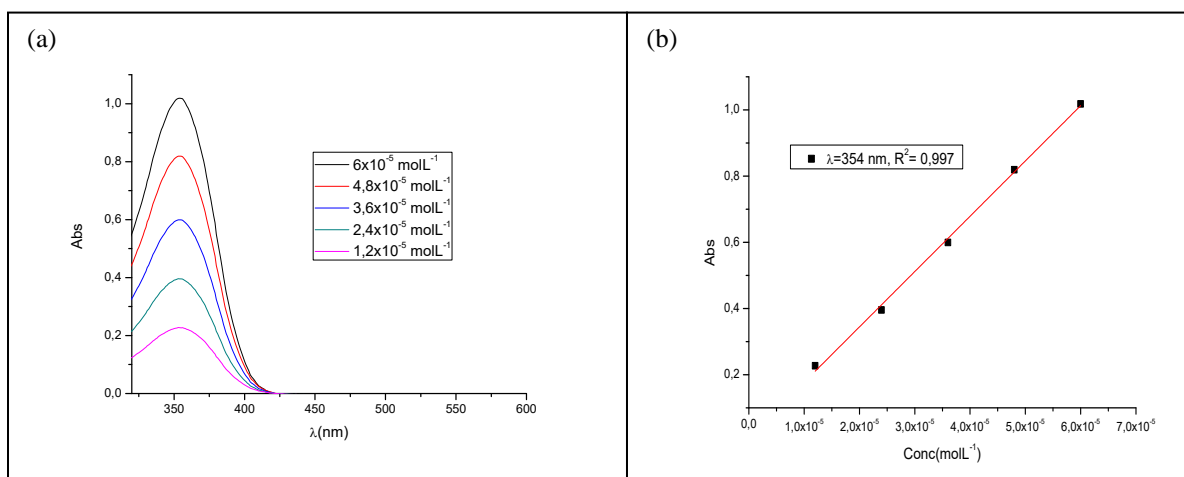


Figura 35 – Espectro eletrônico de (3) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

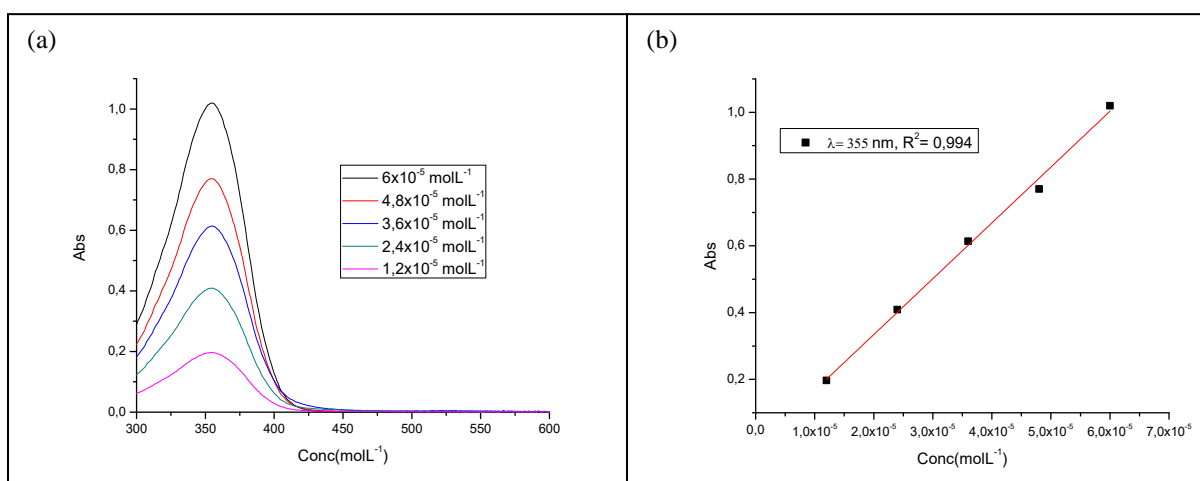


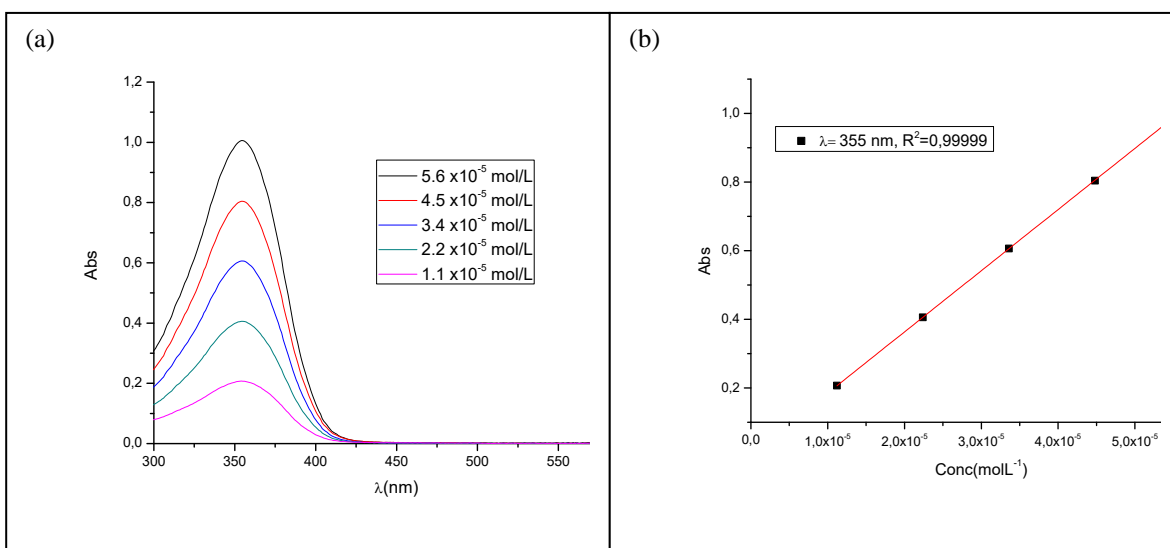
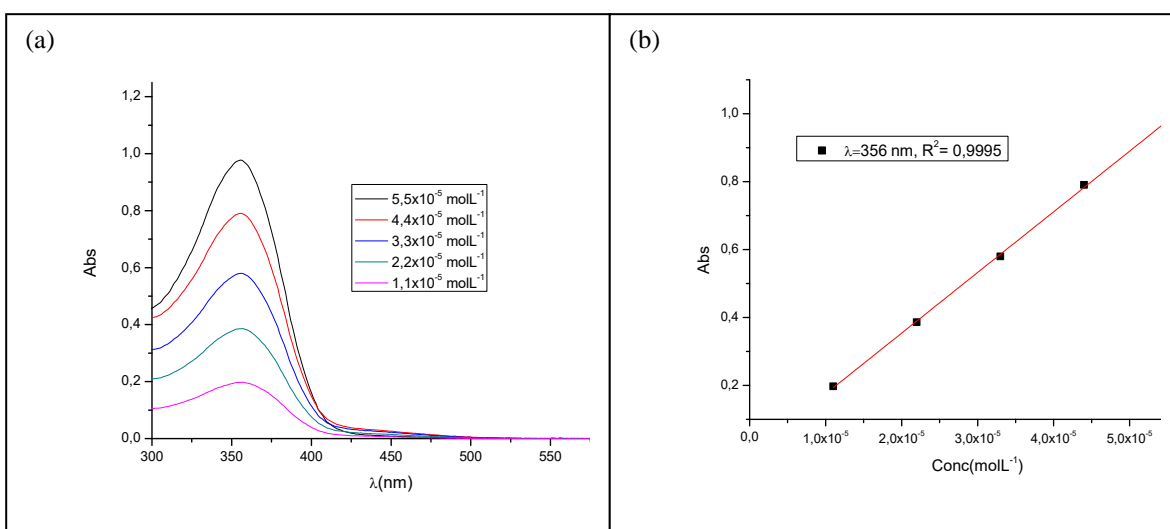
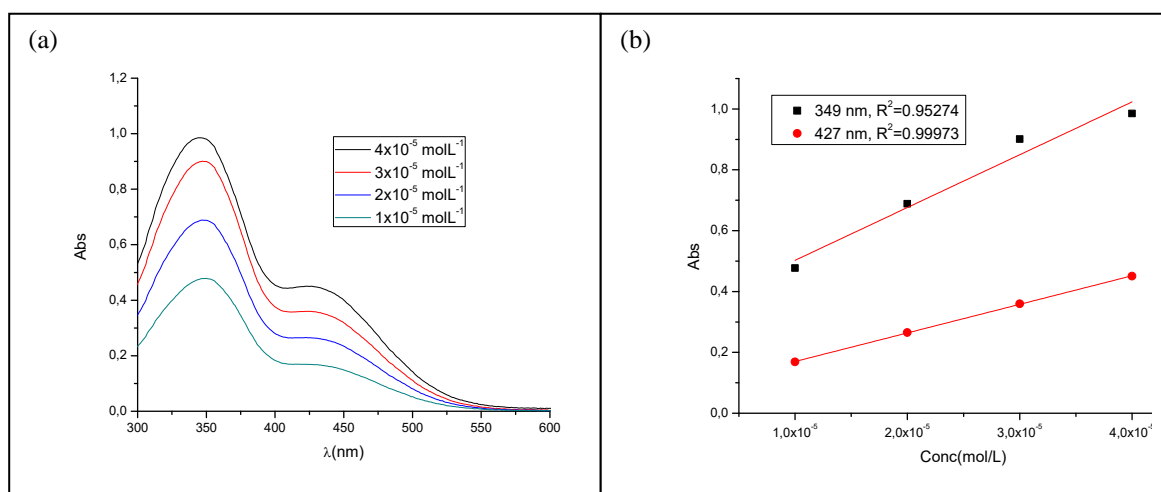
Figura 36 – Espectro eletrônico de (4) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)Figura 37 – Espectro eletrônico de (5) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)Figura 38 – Espectro eletrônico de (7) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

Figura 39 – Espectro eletrônico de (8) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

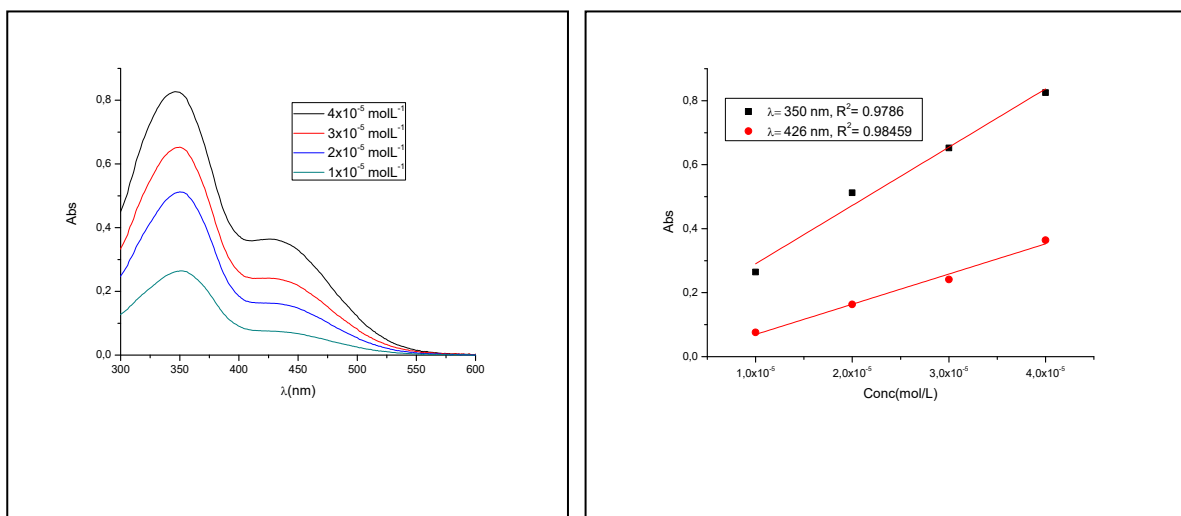


Figura 40 – Espectro eletrônico de (9) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

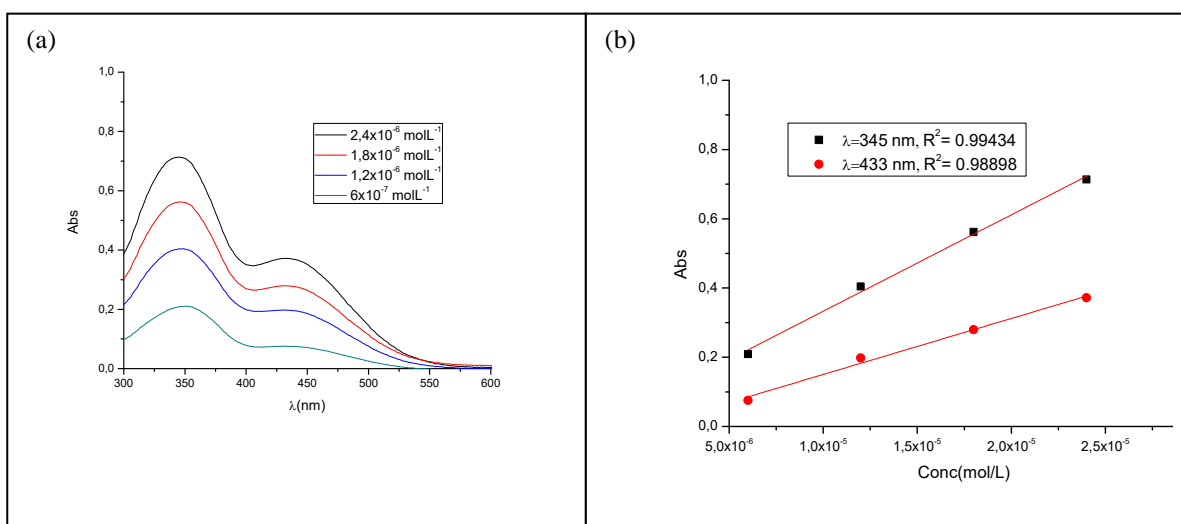


Figura 41 – Espectro eletrônico de (10) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

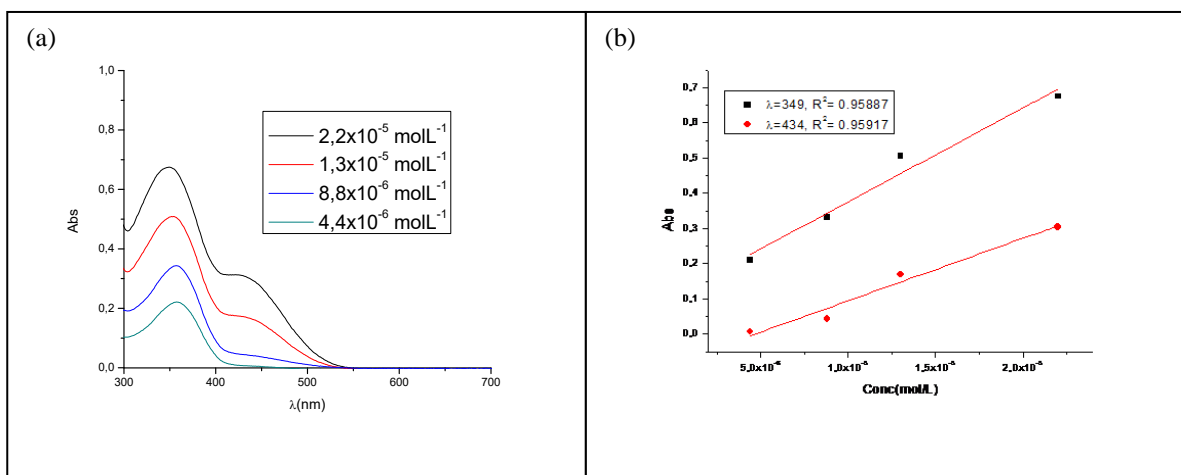


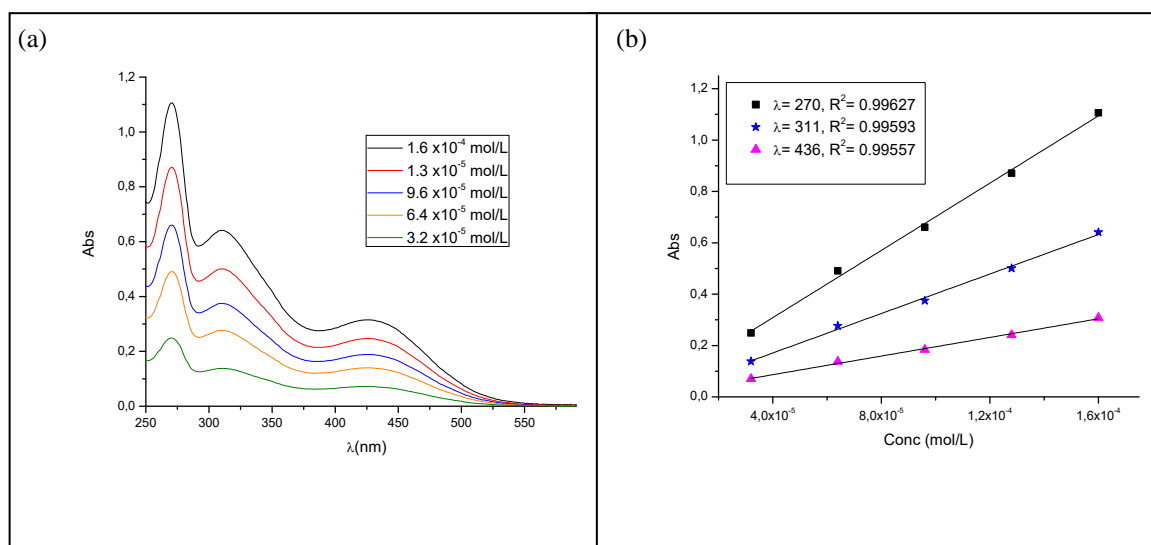
Figura 42 – Espectro eletrônico de (11) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

Figura 43 – Espectro eletrônico de (12)

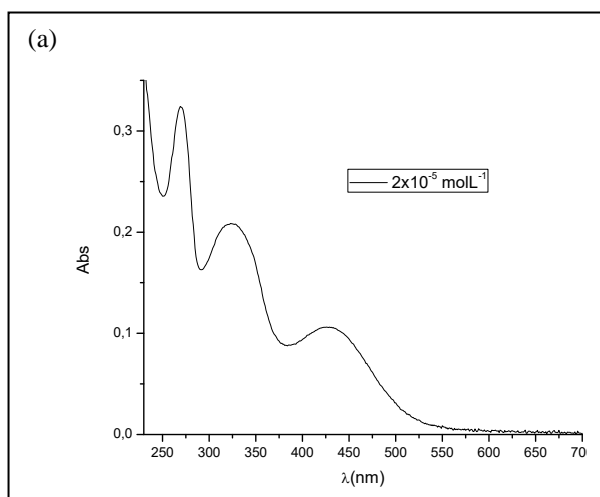
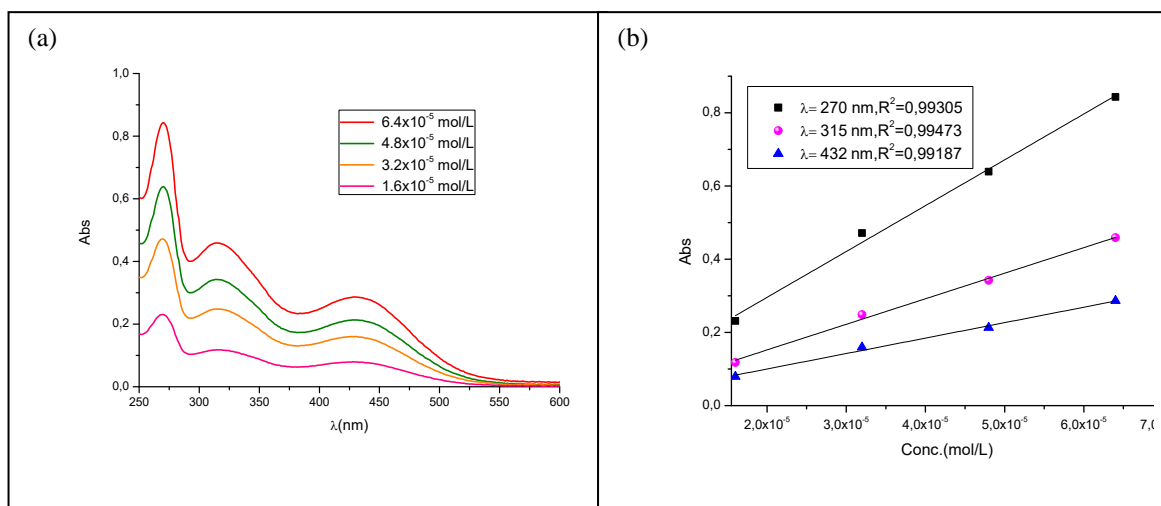
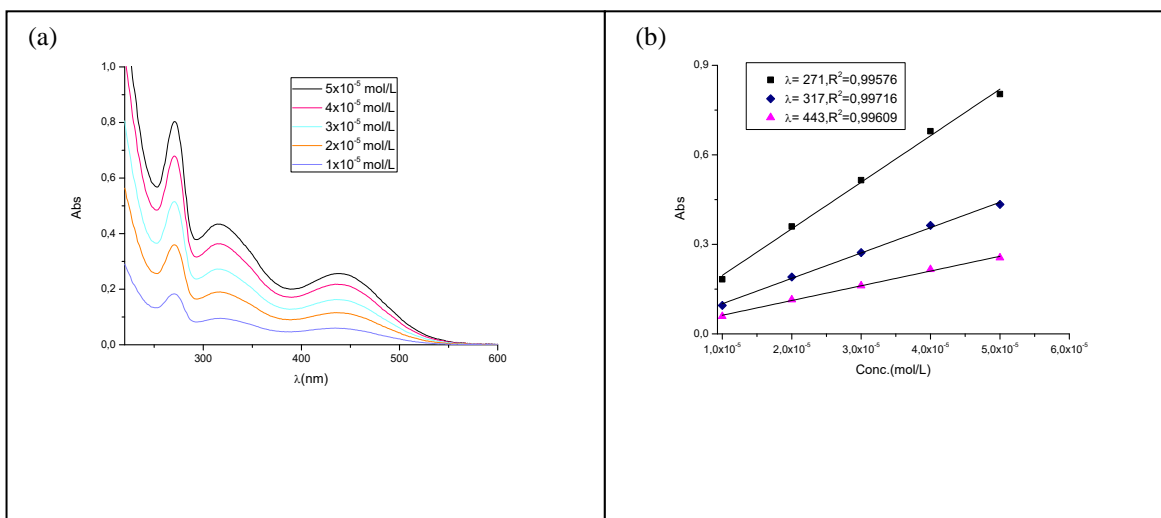
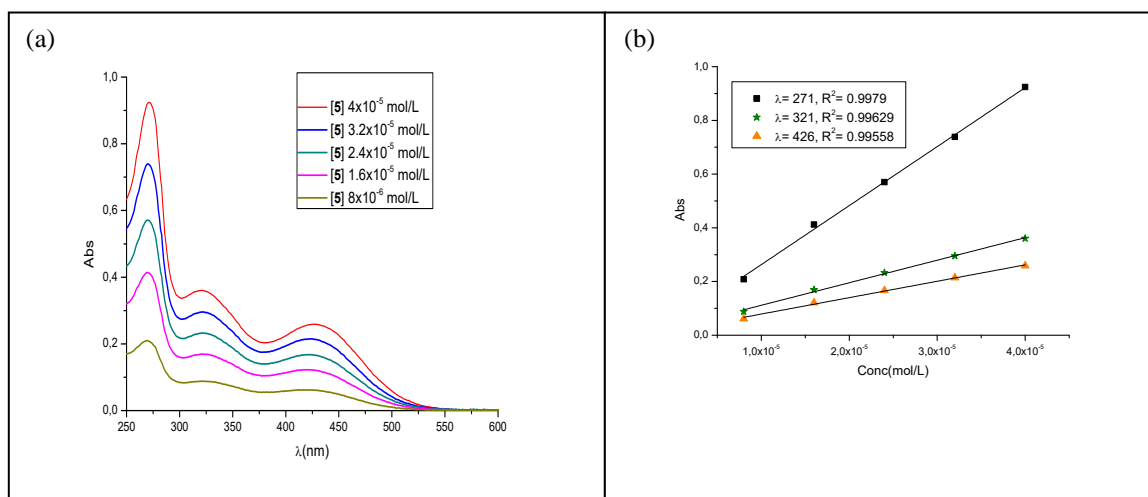
Figura 44 – Espectro eletrônico de (13) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

Figura 45 – Espectro eletrônico de (14)(a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)Figura 46 – Espectro eletrônico de (15) (a) e curvas utilizadas para determinação de ϵ (b)

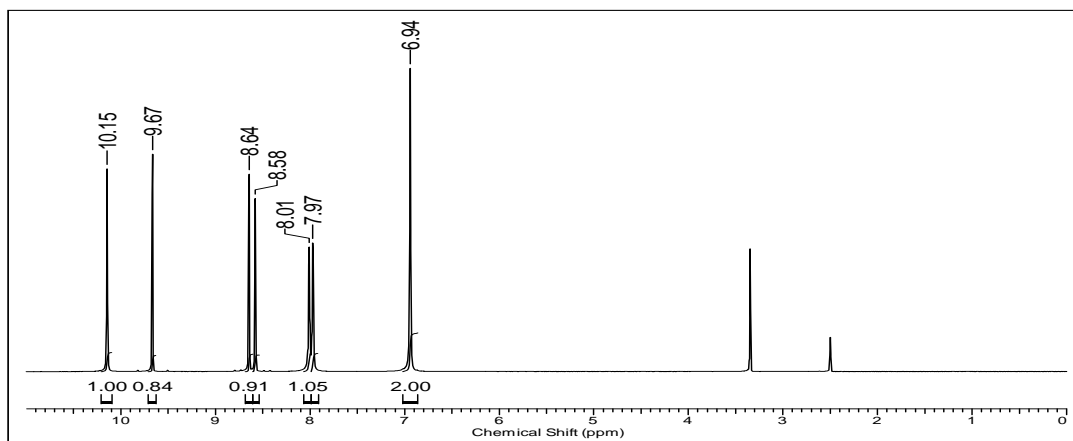
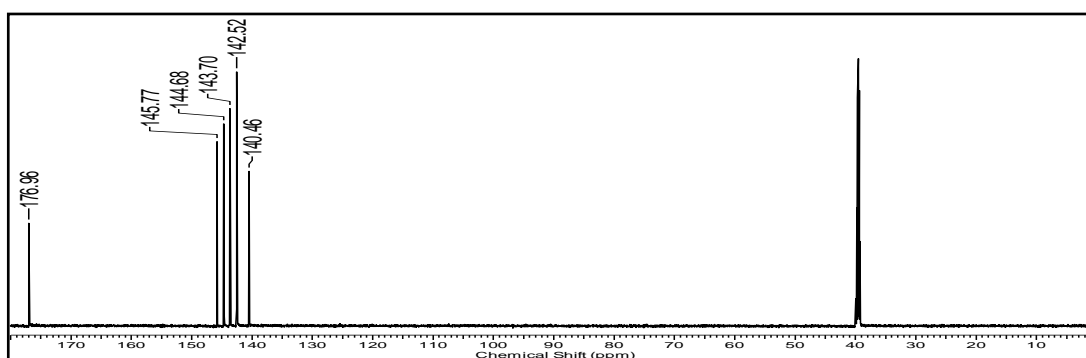
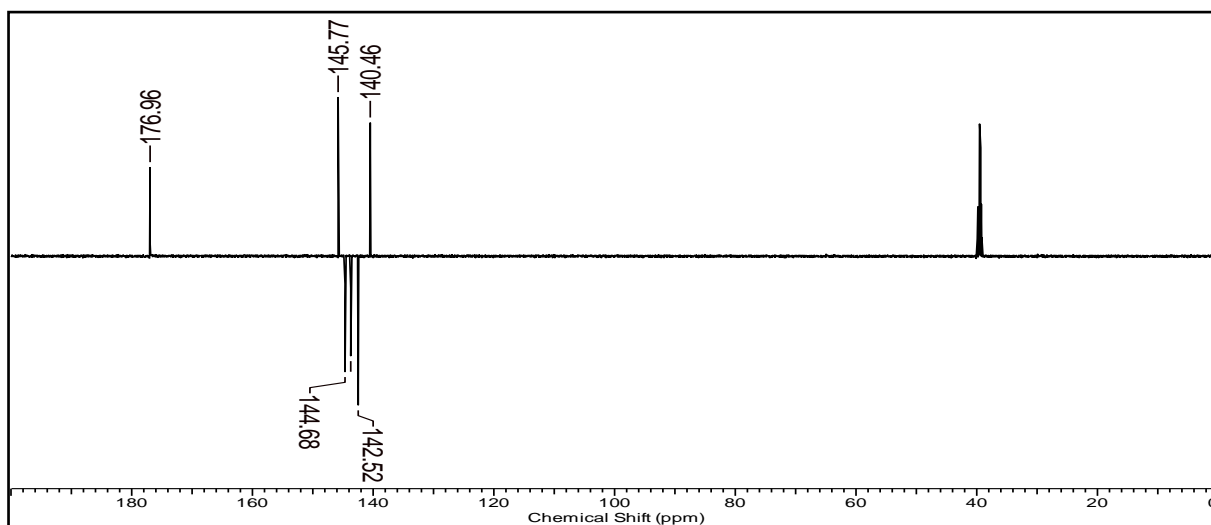
APENDICE C – Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , APT, COSY e HSQCFigura 47 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**1**)Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**1**)Figura 49 – Espectro de APT ($\text{DMSO-}d_6$) do composto (**1**)

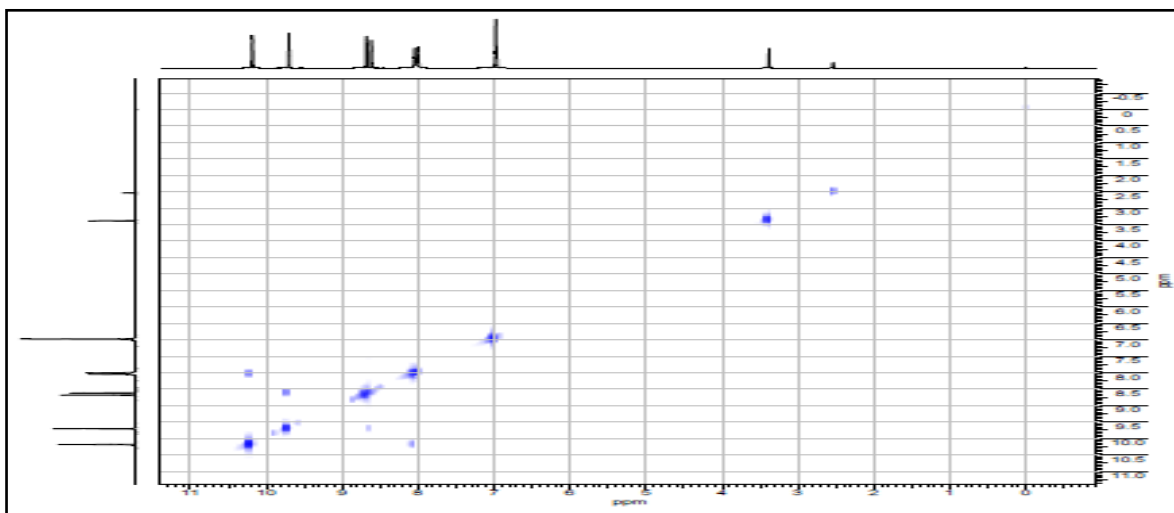
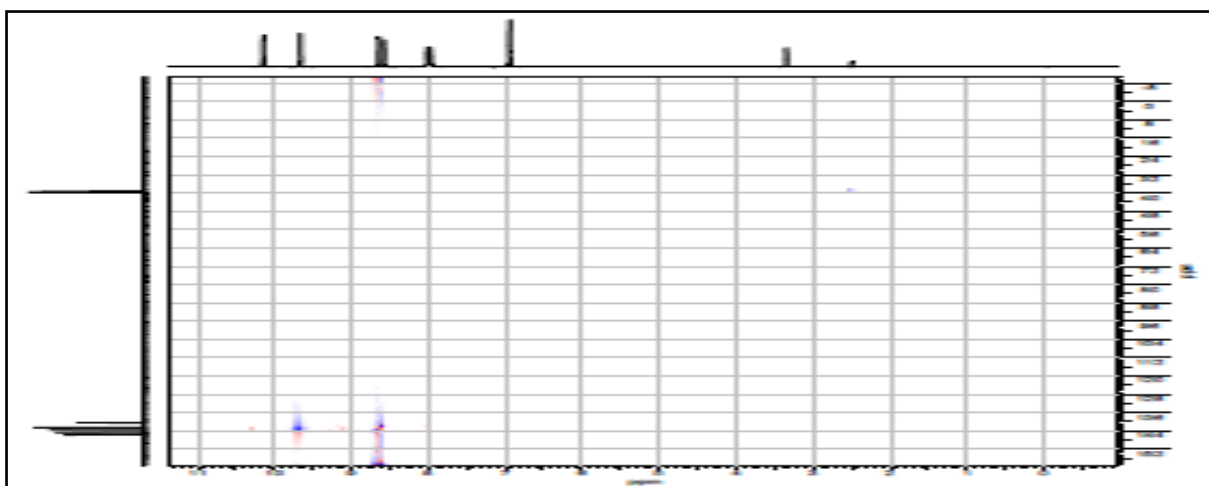
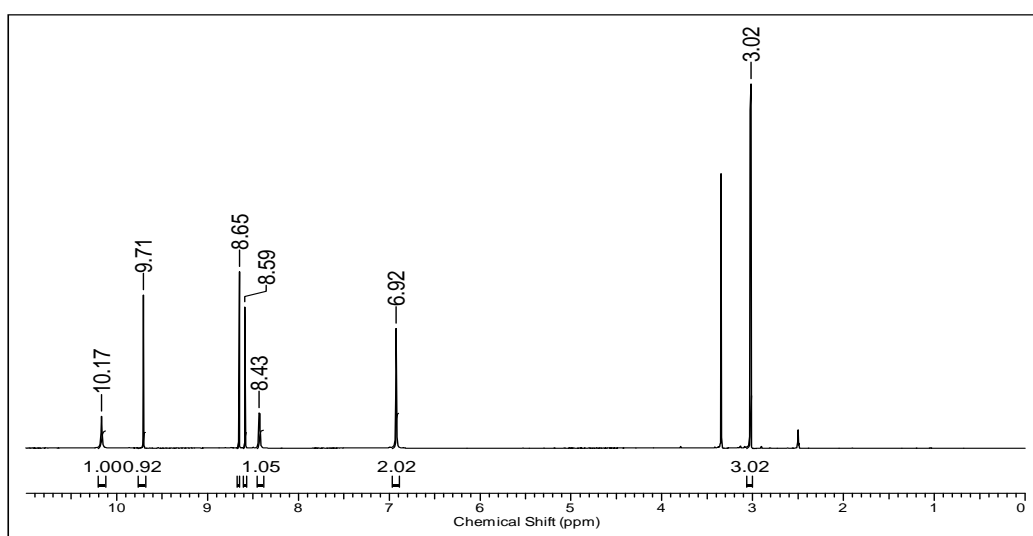
Figura 50 – Espectro de COSY (DMSO- d_6) do composto (1)Figura 51 – Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do composto (1)Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto (2)

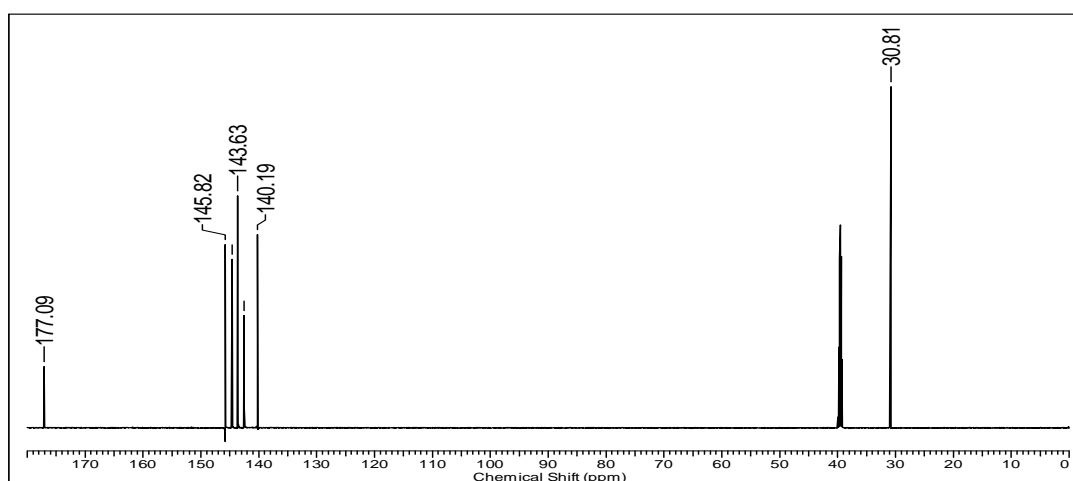
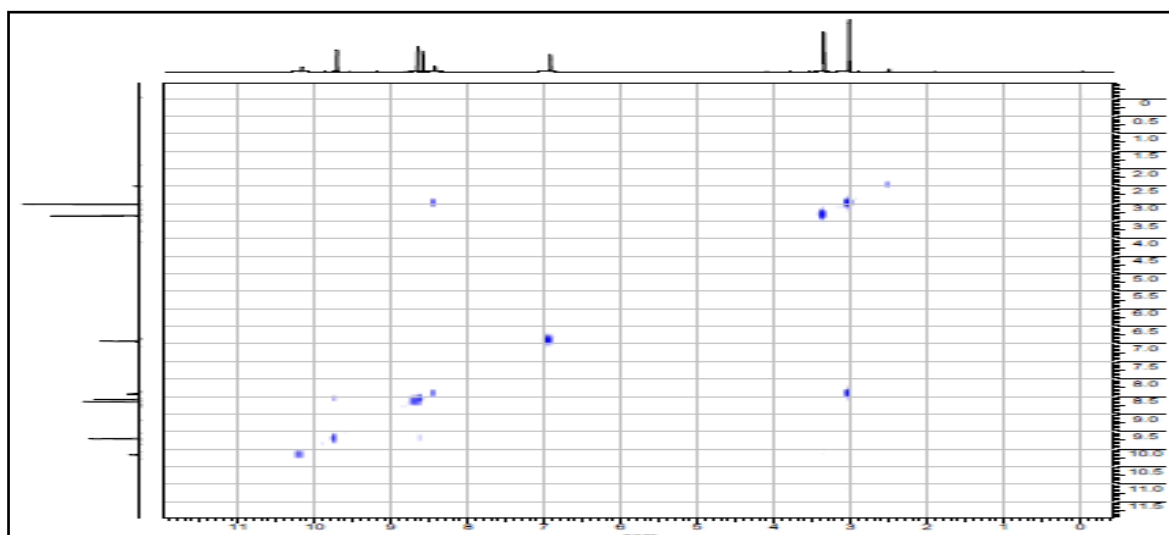
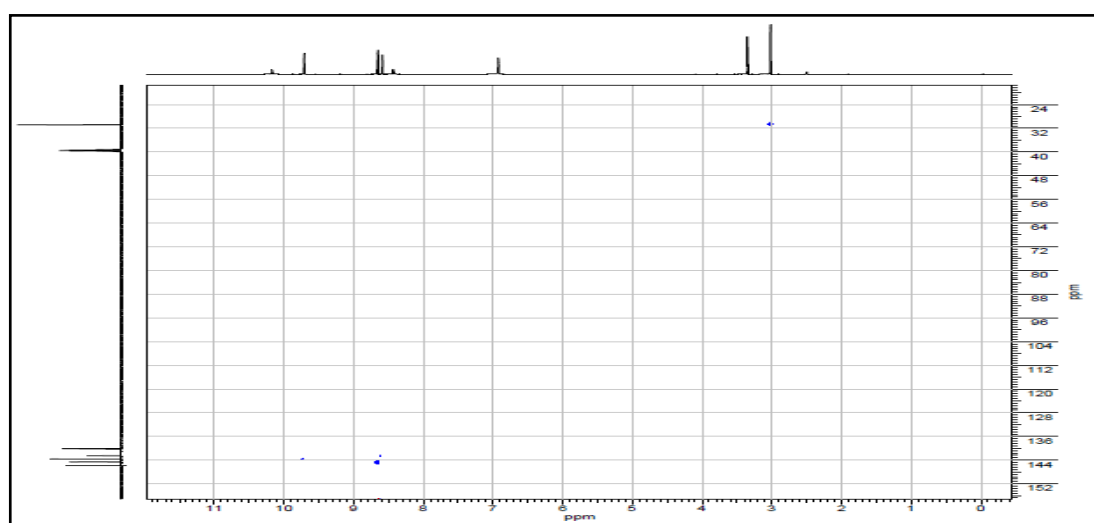
Figure 53 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (2)Figura 54 – Espectro de COSY ($\text{DMSO-}d_6$) do composto (2)Figura 55 – Espectro de HSQC ($\text{DMSO-}d_6$) do composto (2)

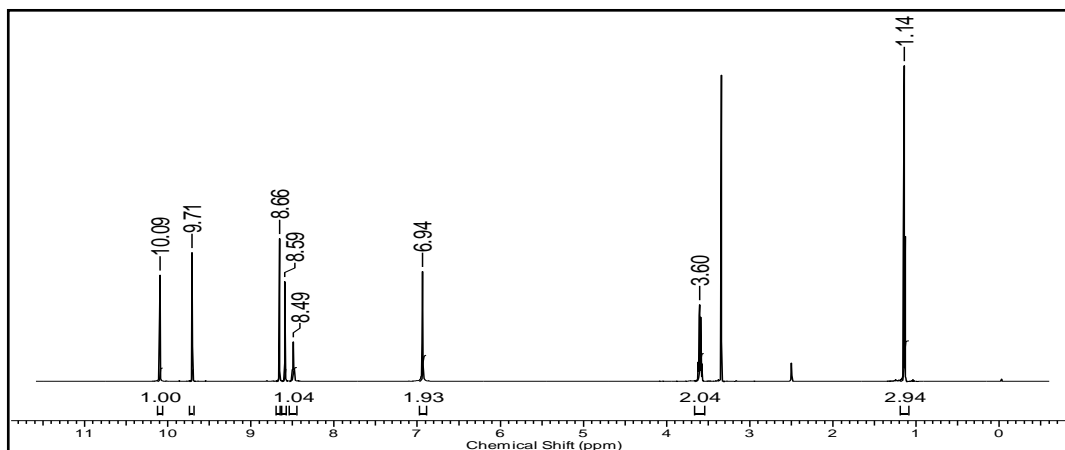
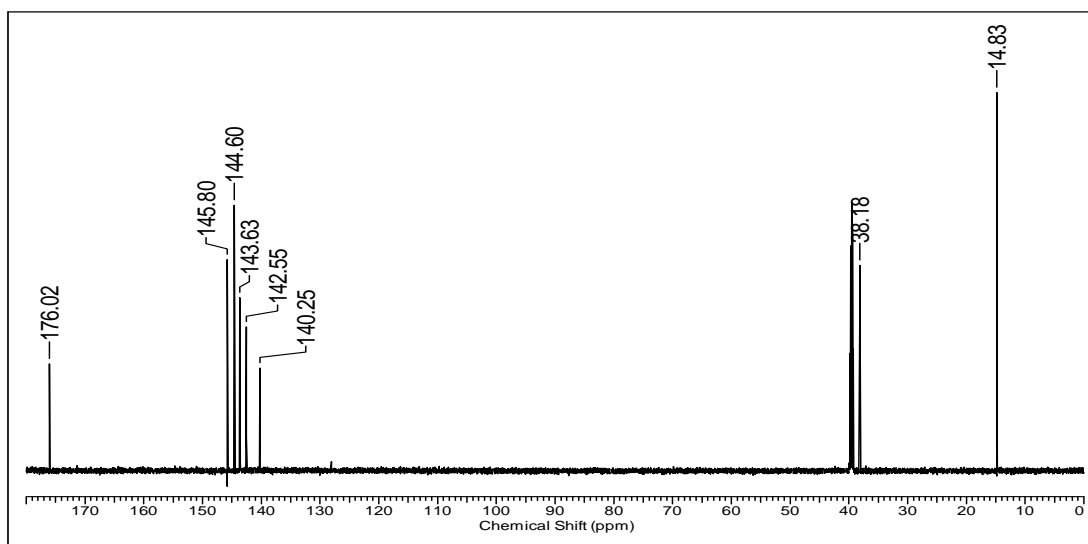
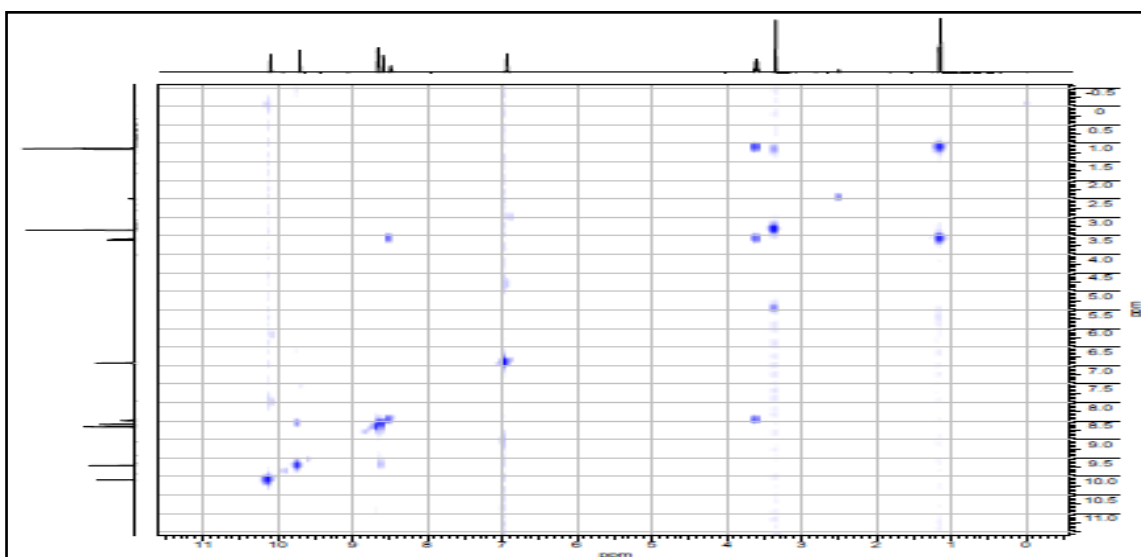
Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (3)Figura 57 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto(3)Figura 58 – Espectro de COSY ($\text{DMSO-}d_6$) do composto (3)

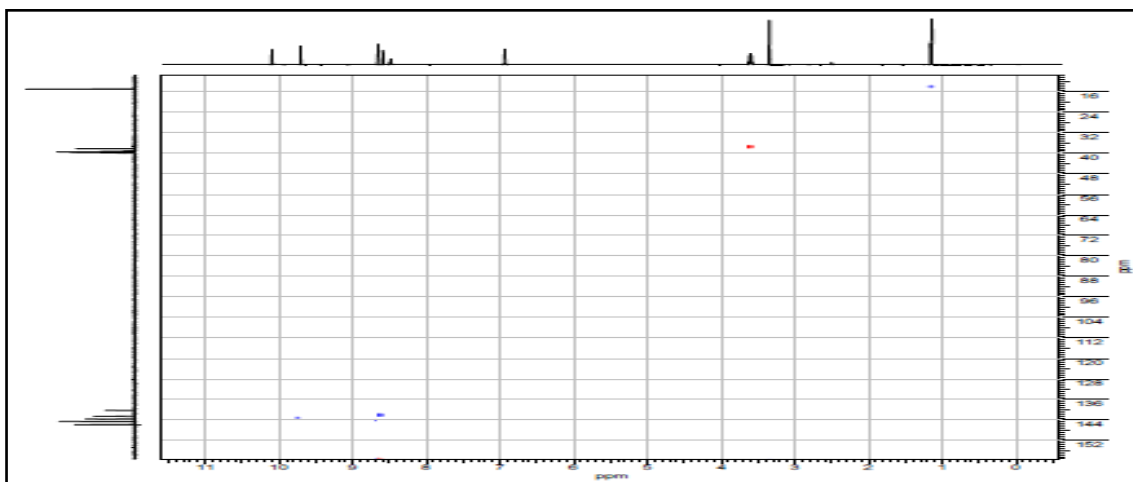
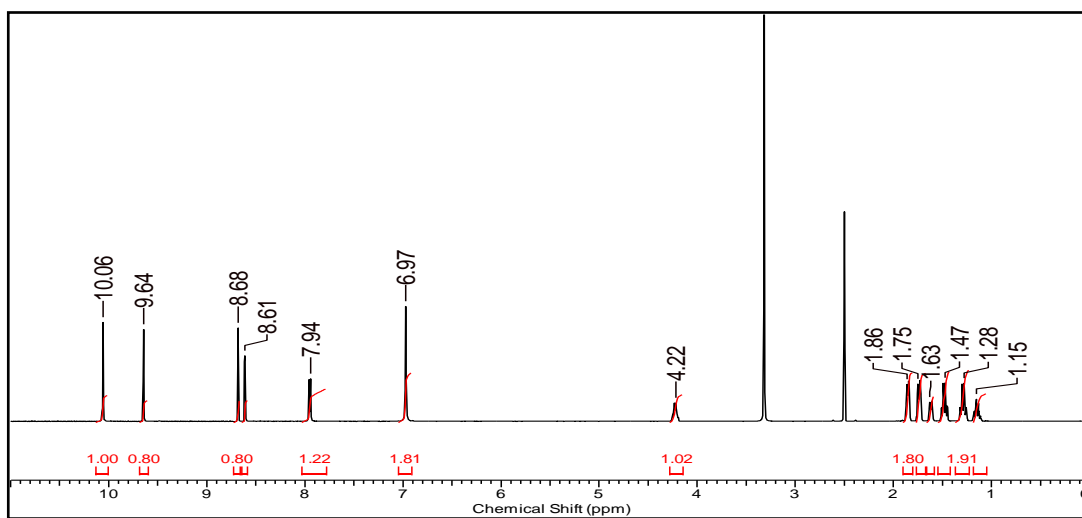
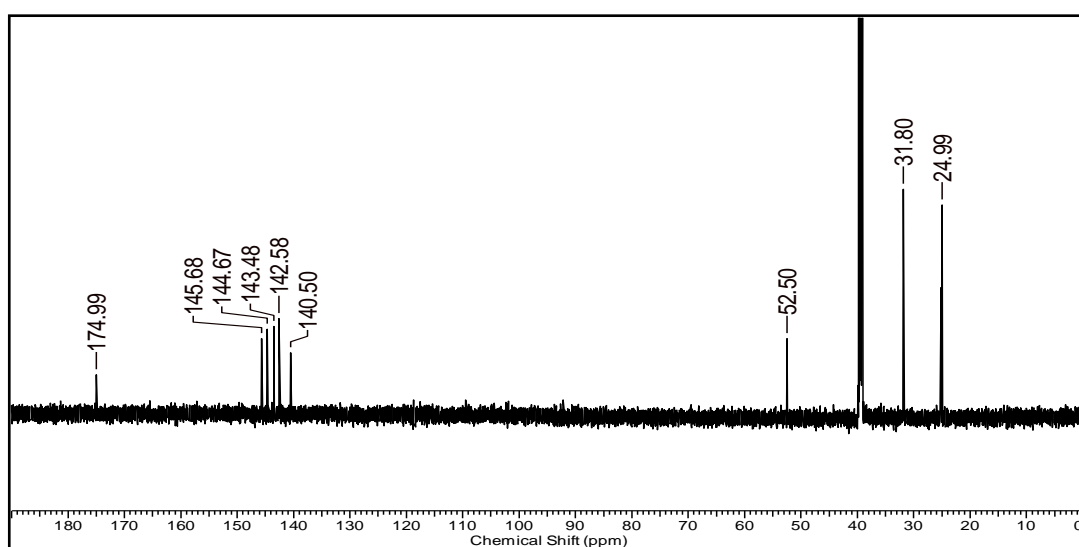
Figura 59 – Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do composto (3)Figura 60 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto (4)Figura 61 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) do composto (4)

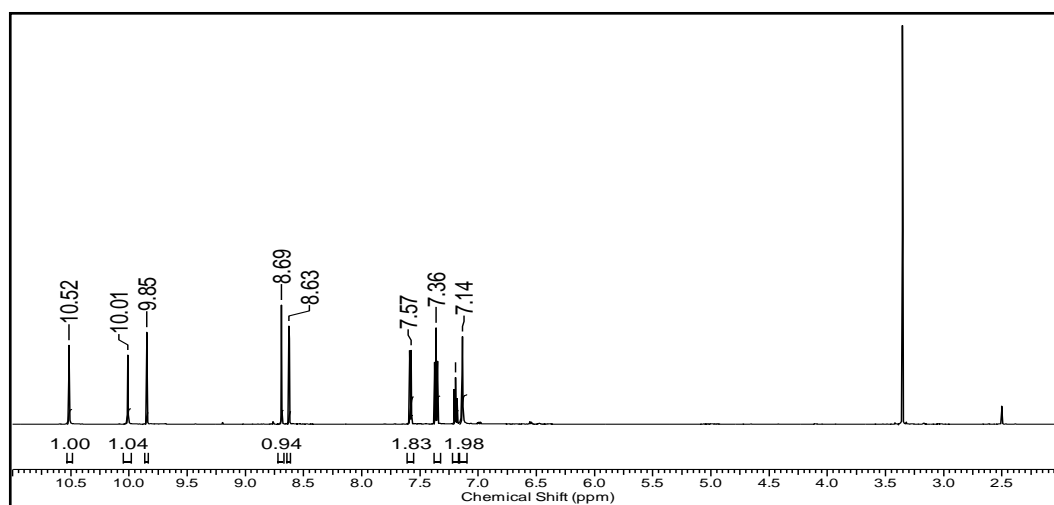
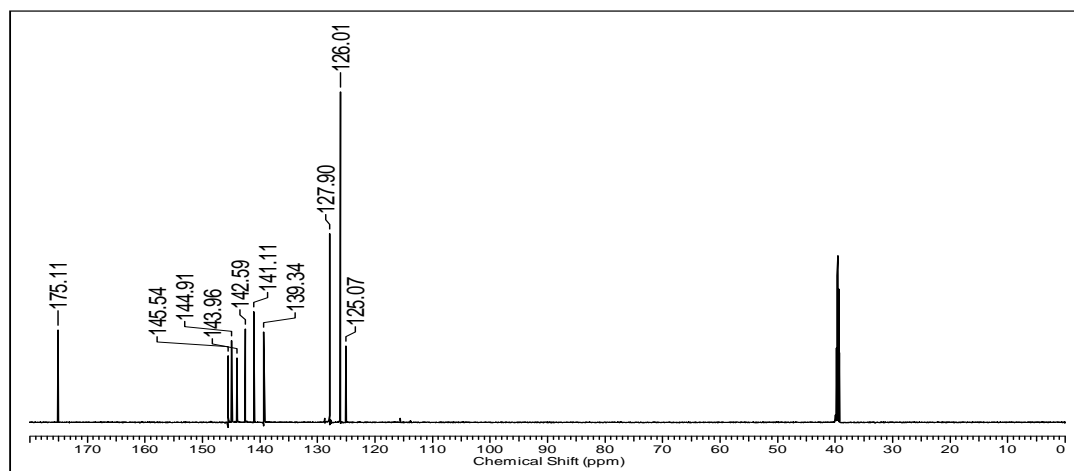
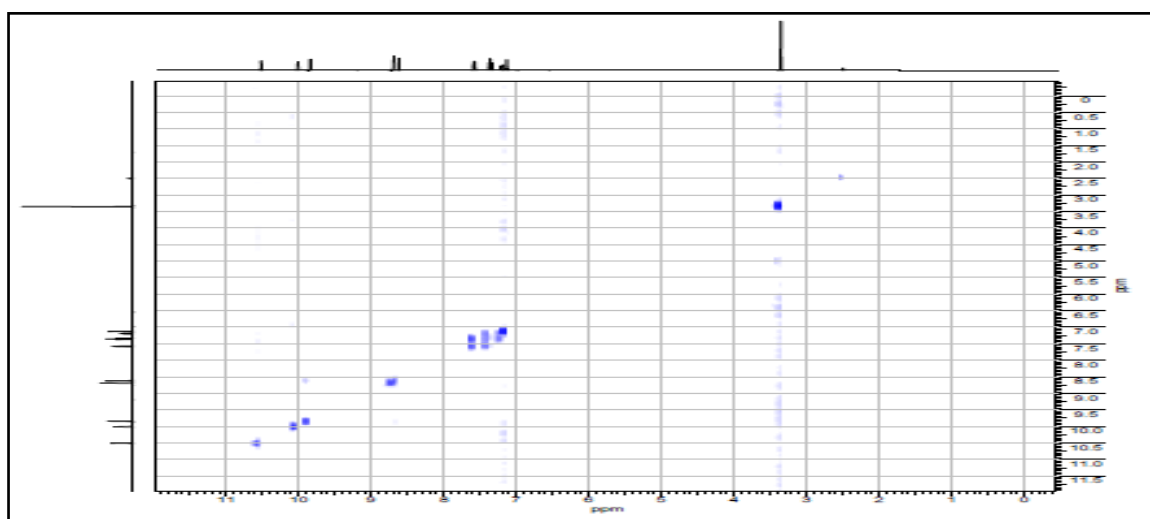
Figura 62 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (5)Figura 63 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (5)Figura 64 – Espectro de COSY ($\text{DMSO-}d_6$) do composto (5)

Figura 65 – Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do composto (5)

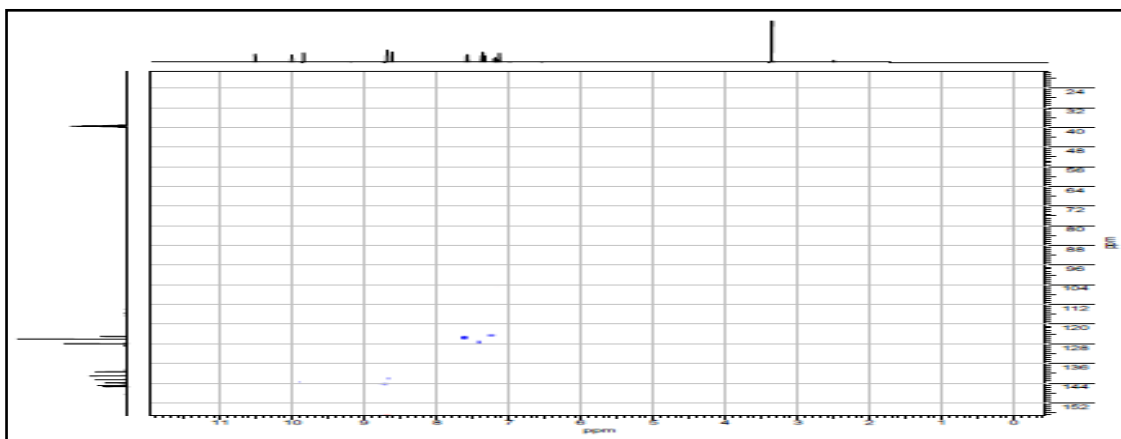


Figura 66 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do produto (6)

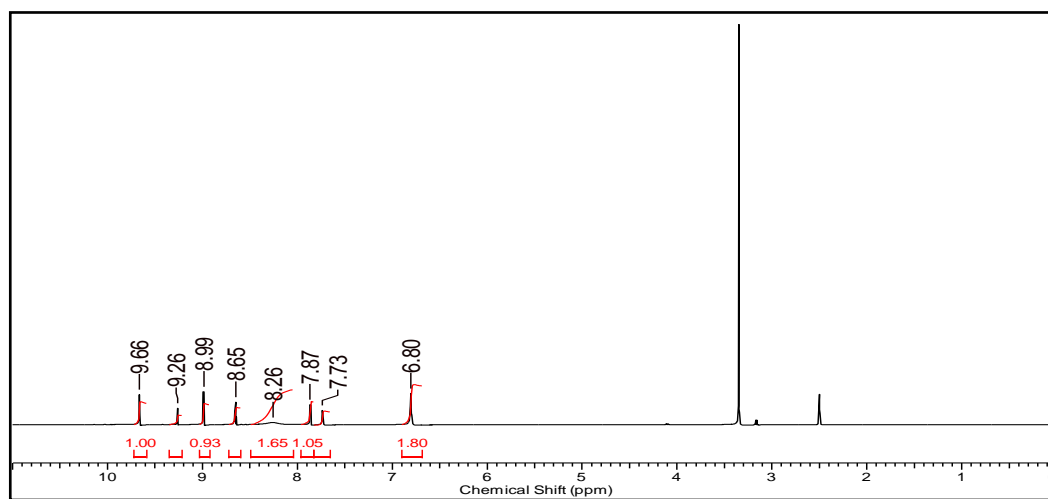


Figura 67 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do produto (6)

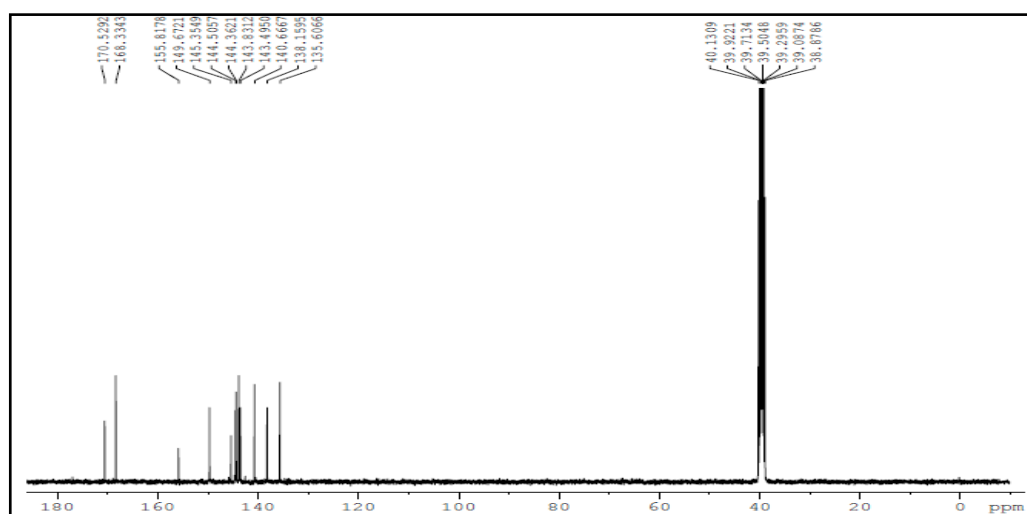


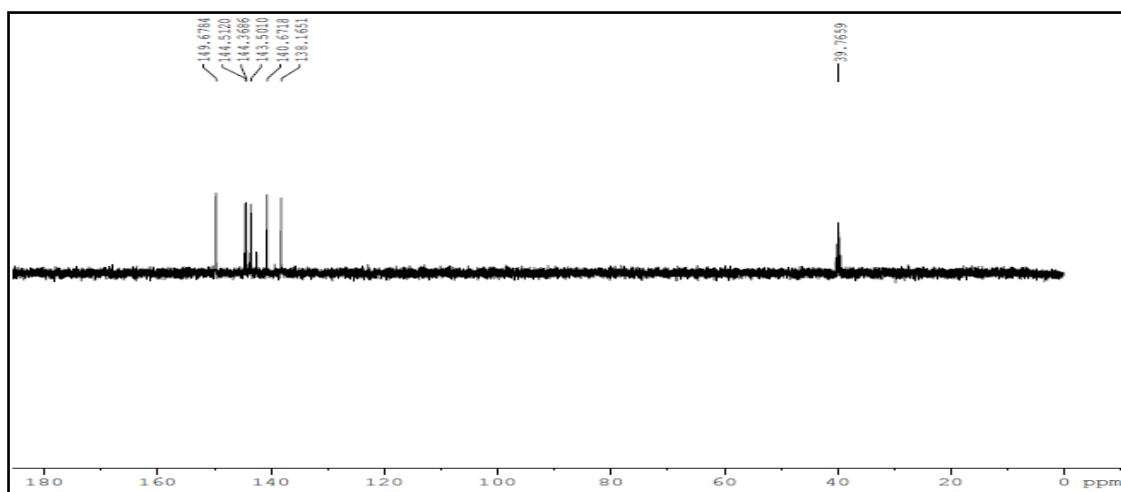
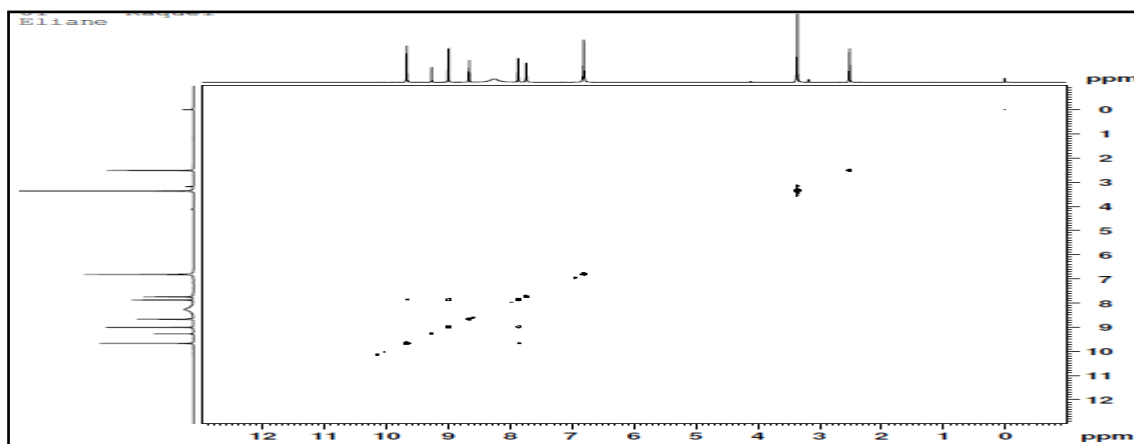
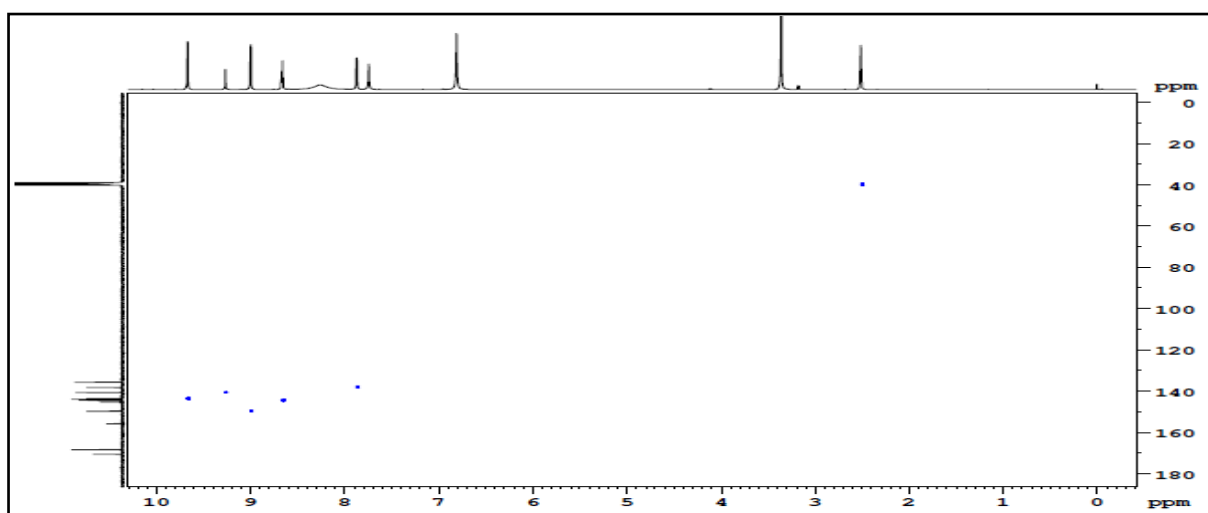
Figura 68 – Espectro de APT (DMSO- d_6) do produto (6)Figura 69 – Espectro de COSY (DMSO- d_6) do produto (6)Figura 70 – Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do produto (6)

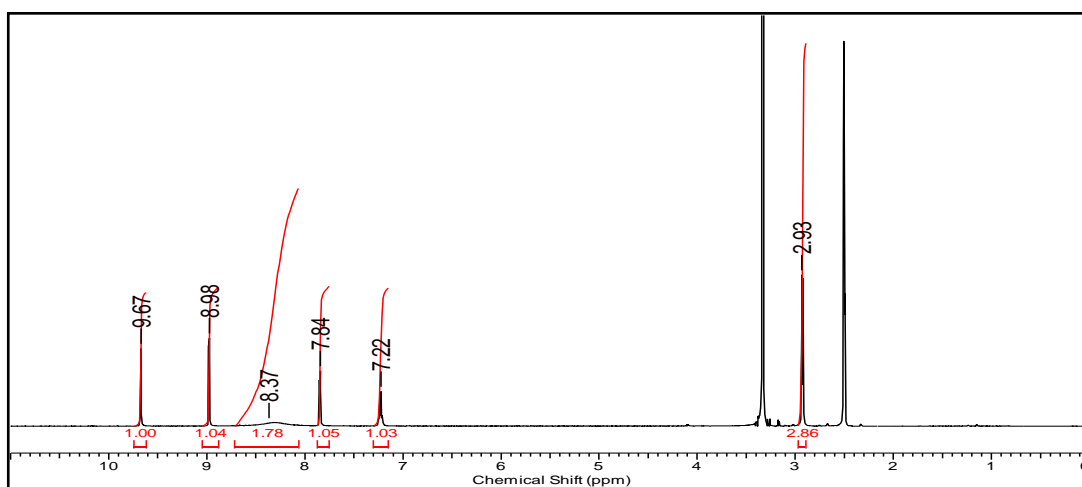
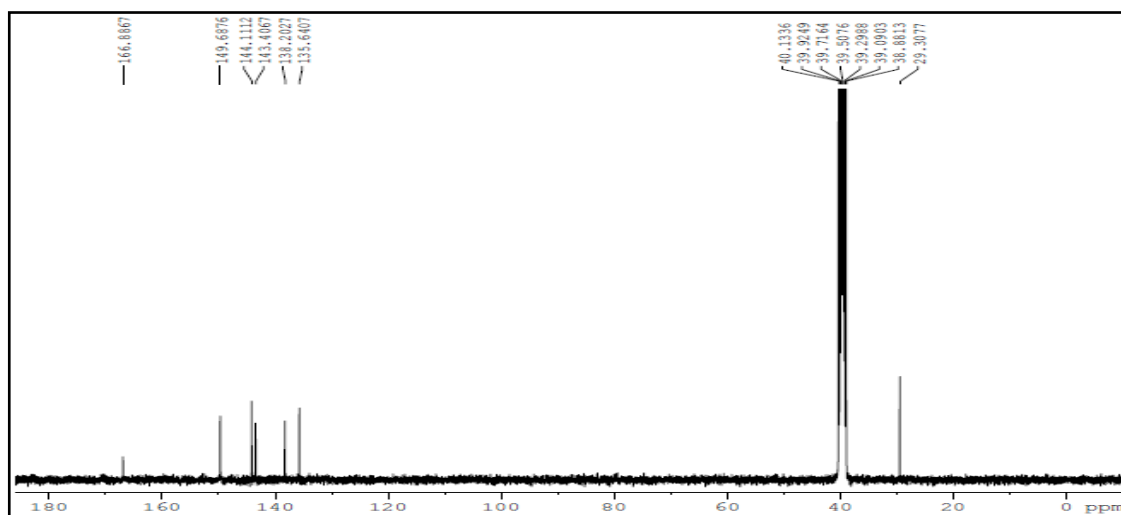
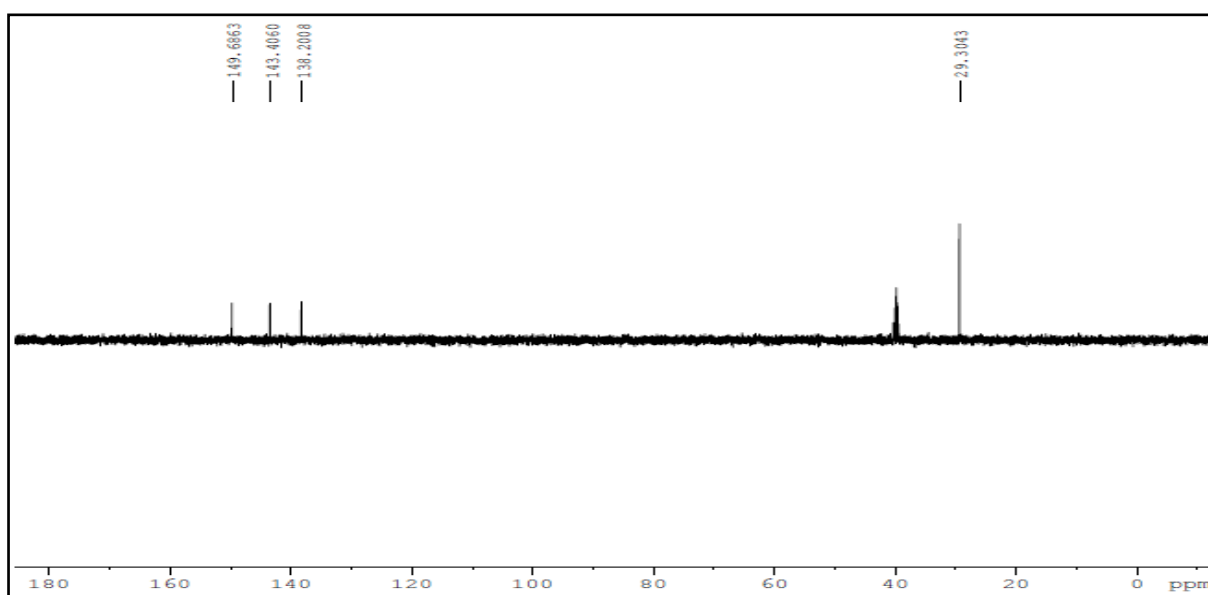
Figura 71– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo (7)Figura 72– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo (7)Figura 73– Espectro de APT ($\text{DMSO-}d_6$) do complexo (7)

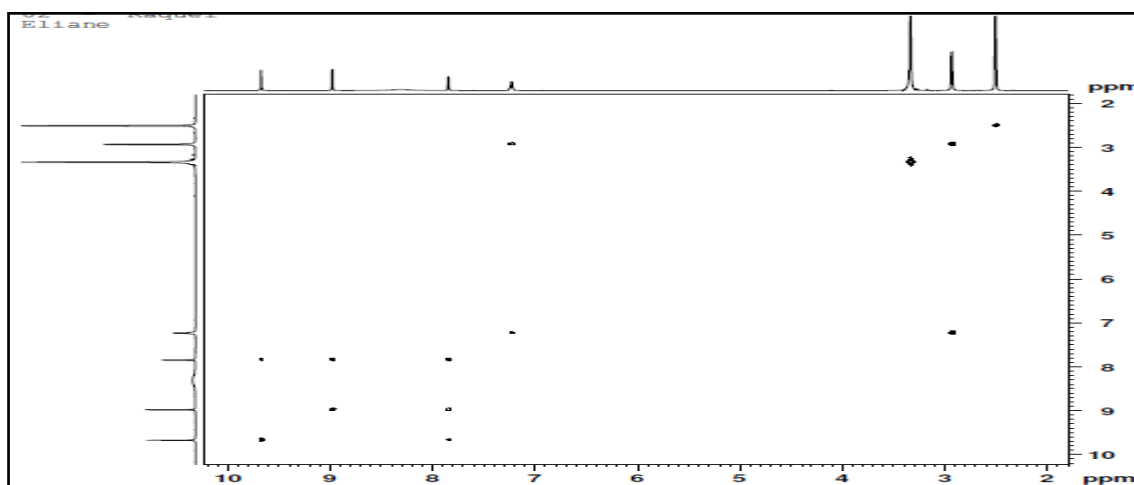
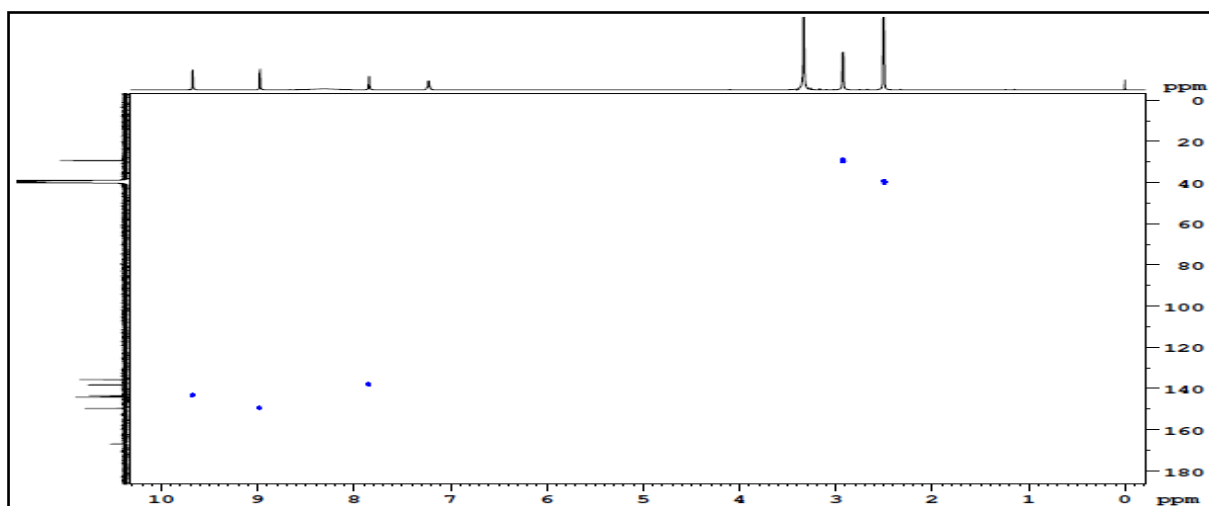
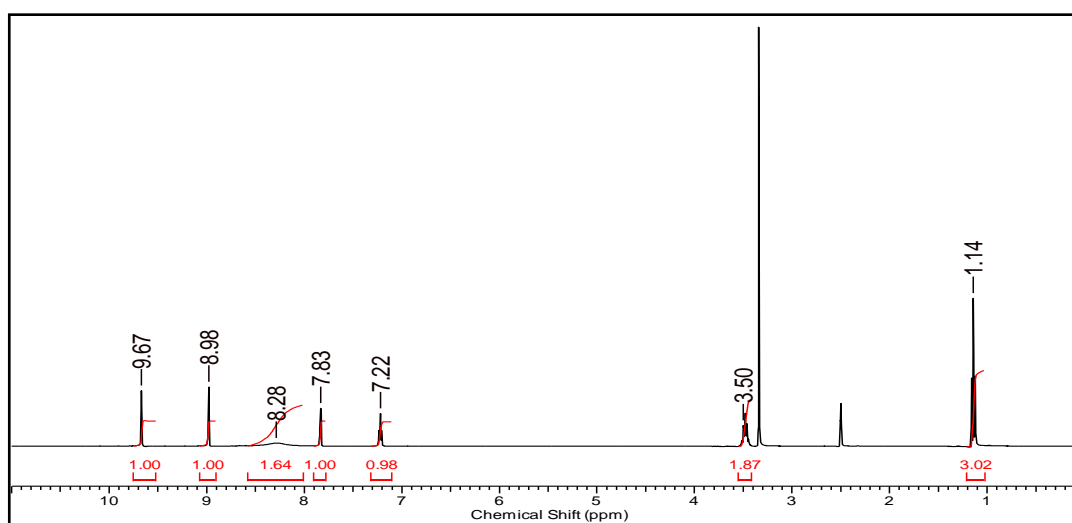
Figura 74–Espectro COSY (DMSO- d_6) do complexo (7)Figura 75–Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do complexo (7)Figura 76– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo (8)

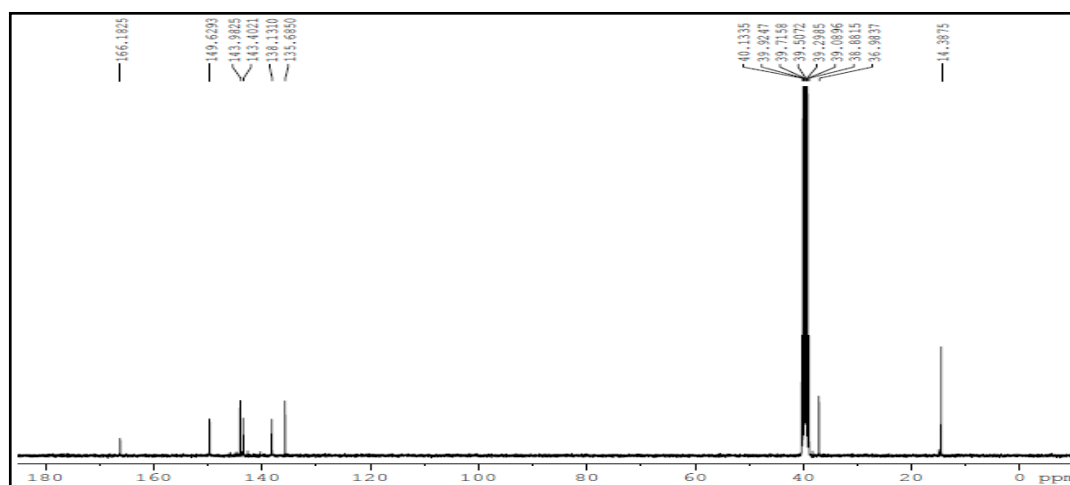
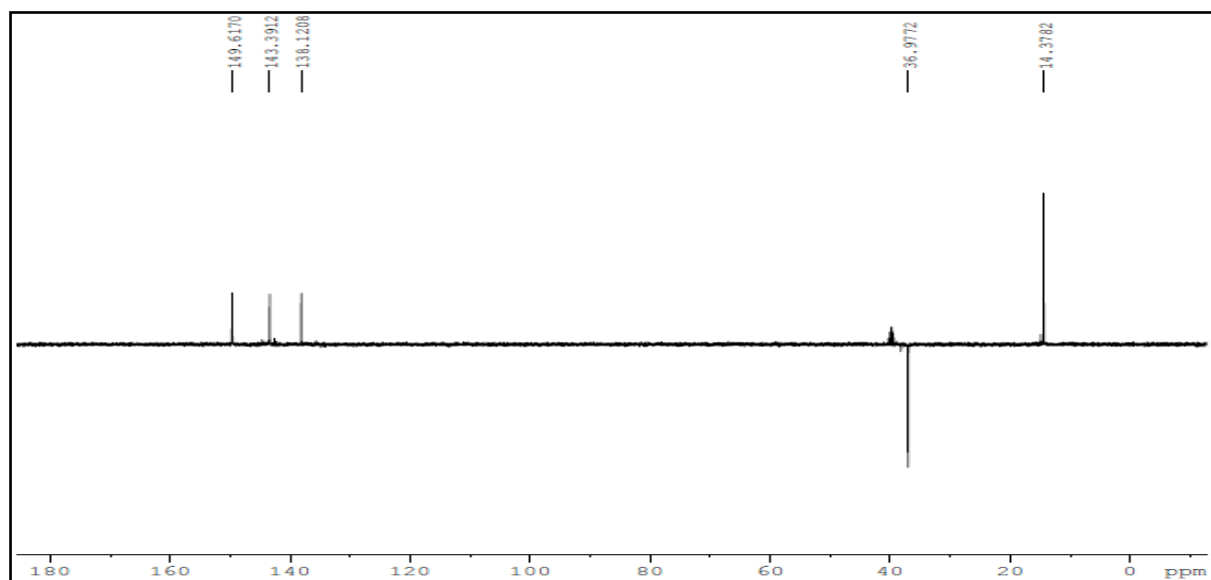
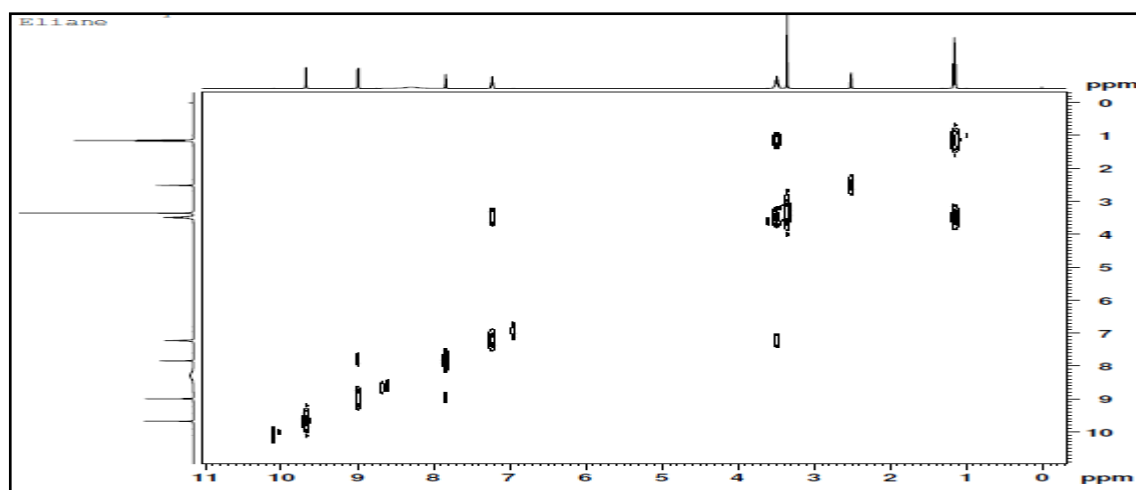
Figura 77– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo (**8**)Figura 78– Espectro de APT ($\text{DMSO-}d_6$) do complexo (**8**)Figura 79– Espectro de COSY ($\text{DMSO-}d_6$) do complexo (**8**)

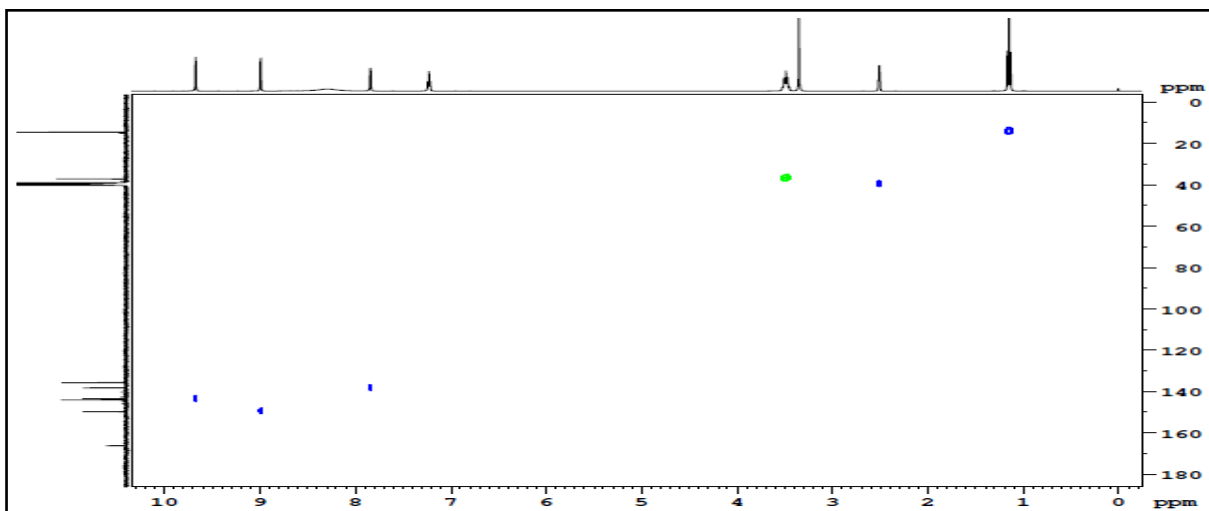
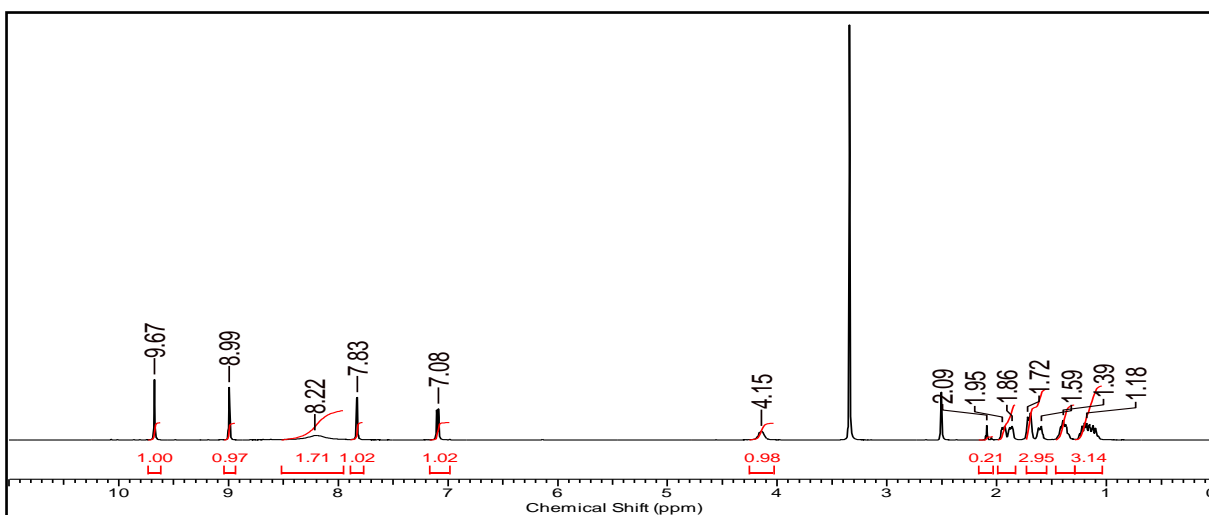
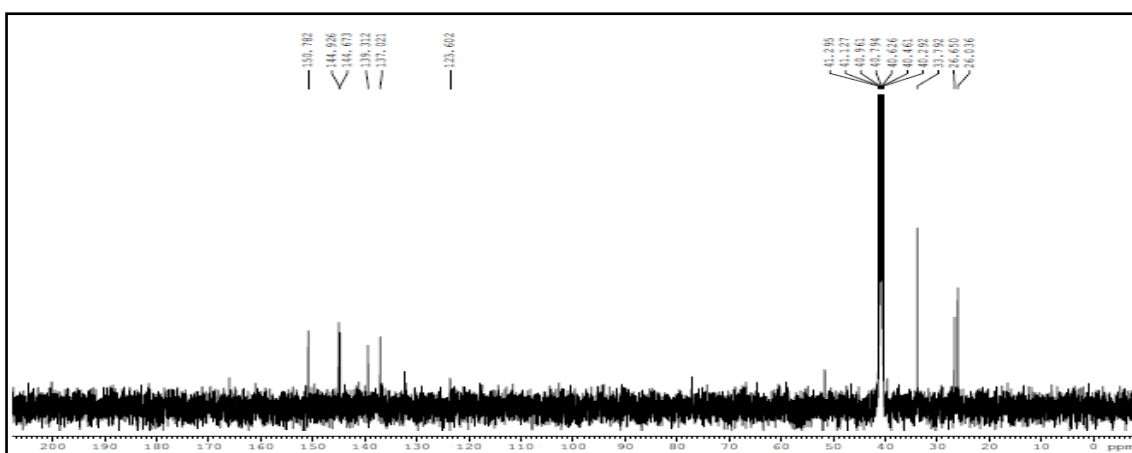
Figura 80–. Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do complexo (8)Figura 81– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo (9)Figura 82– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do complexo (9)

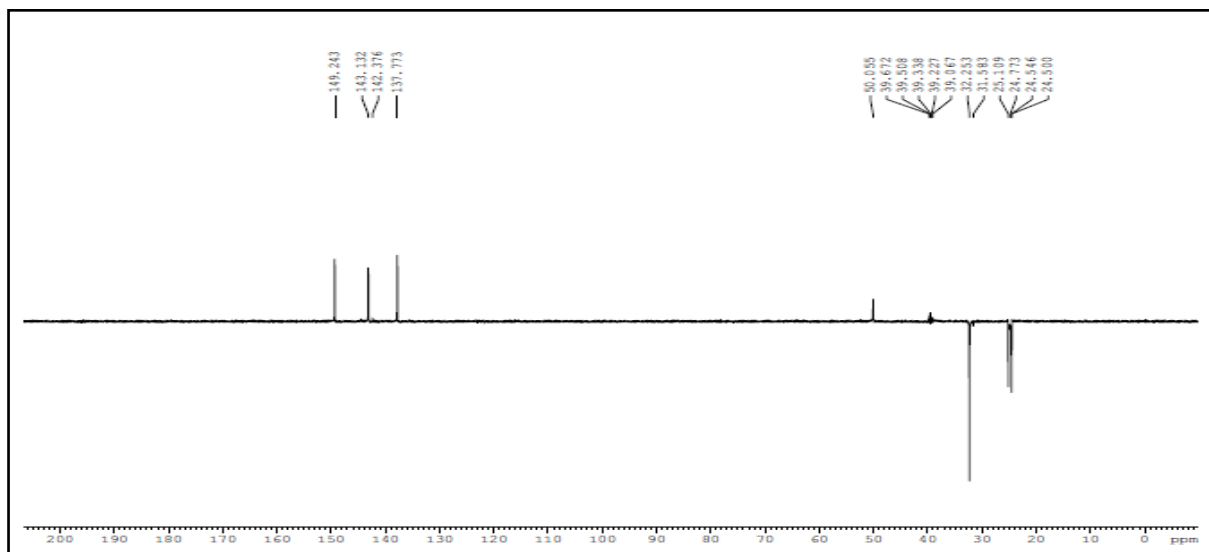
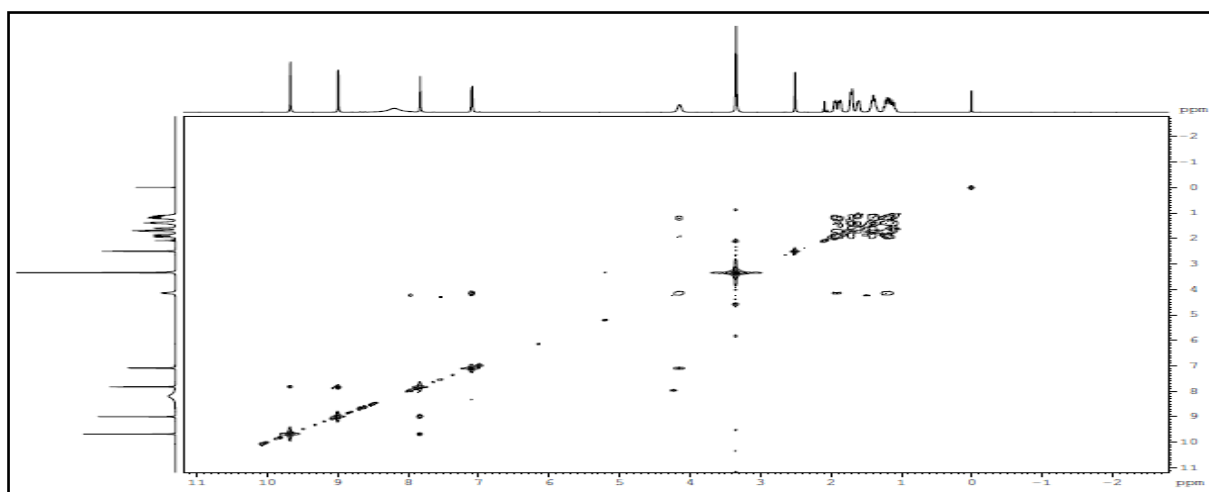
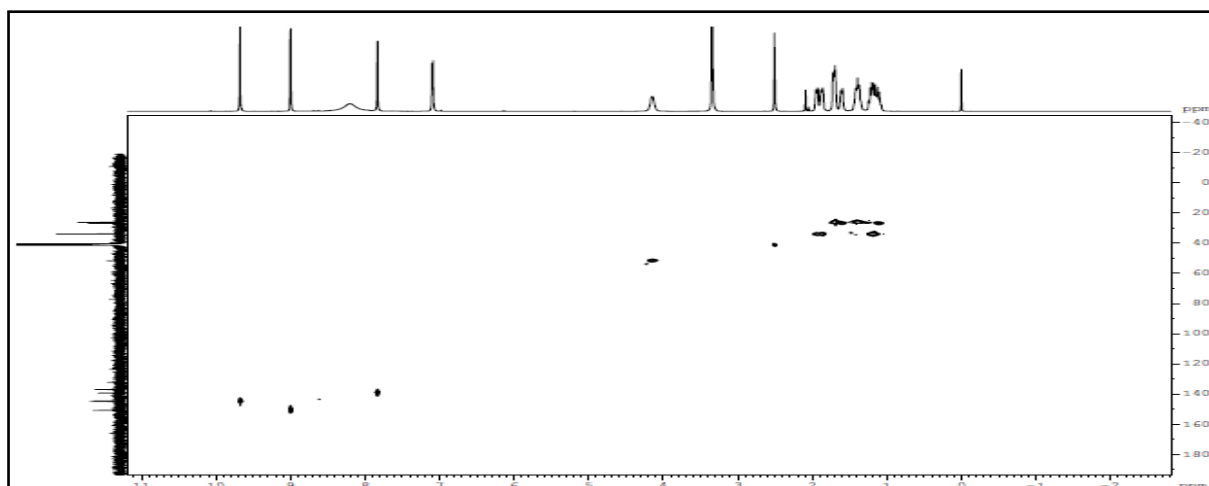
Figura 83– Espectro de APT (DMSO- d_6) do complexo (9)Figura 84– Espectro de COSY (DMSO- d_6) do complexo (9)Figura 85– Espectro de HSQC (DMSO- d_6) do complexo (9)

Figura 86– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo (10)

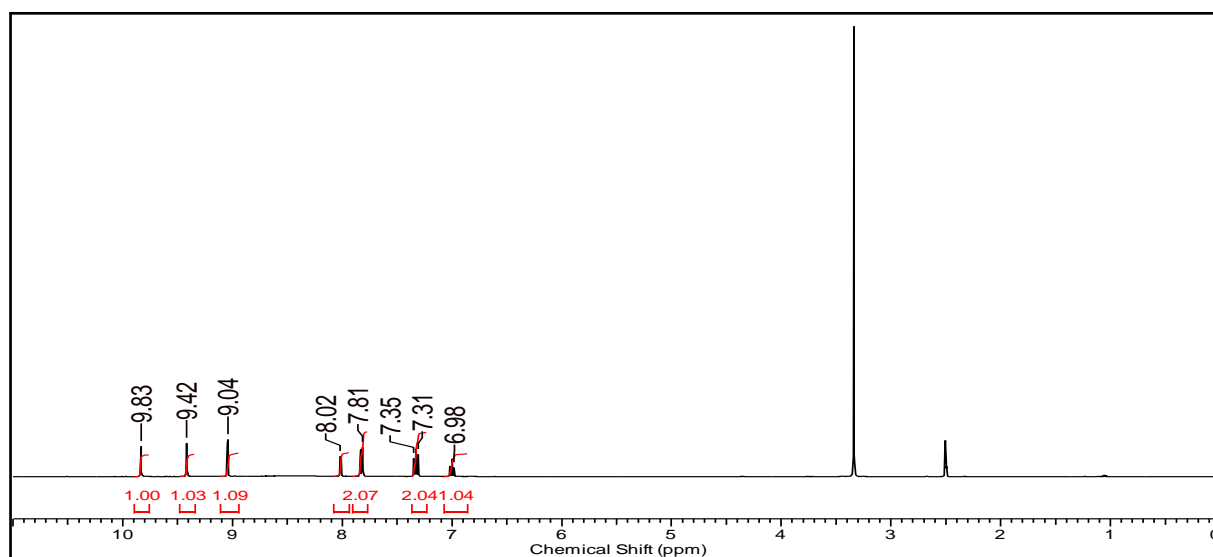


Figura 87– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do complexo (10)

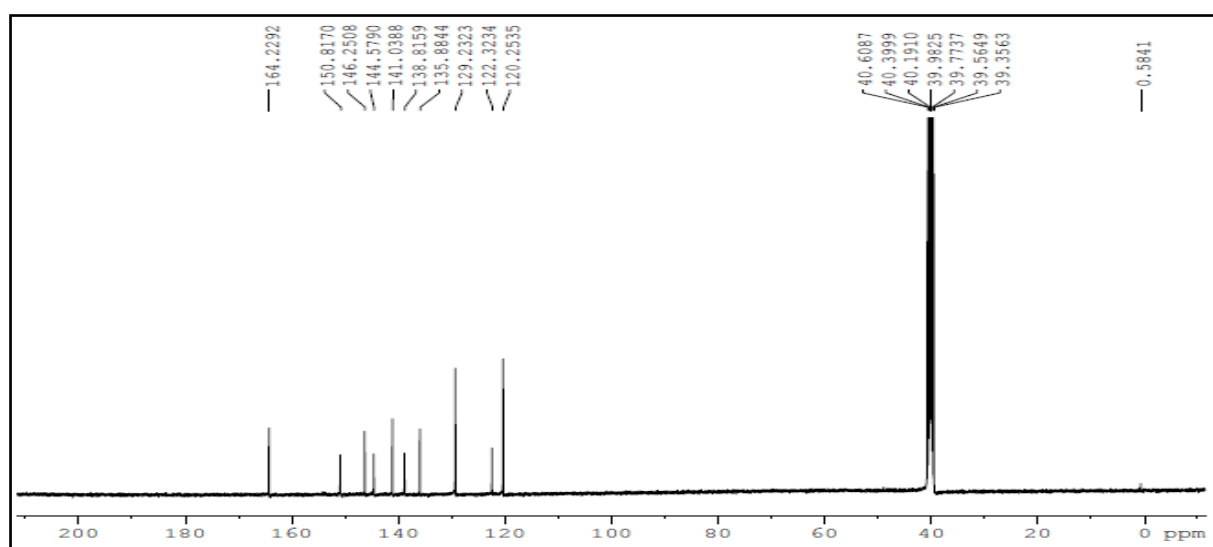


Figura 88– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do complexo (11)

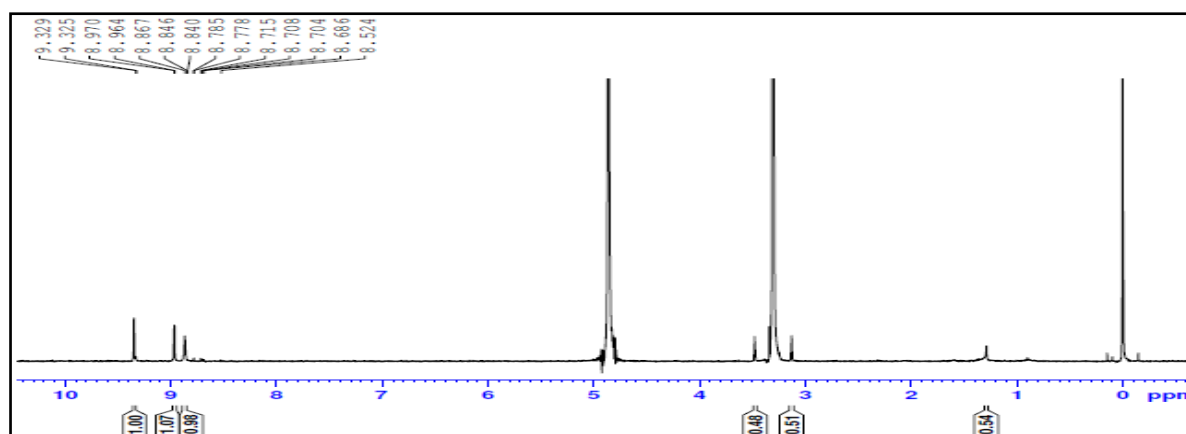


Figura 89– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do complexo (12)

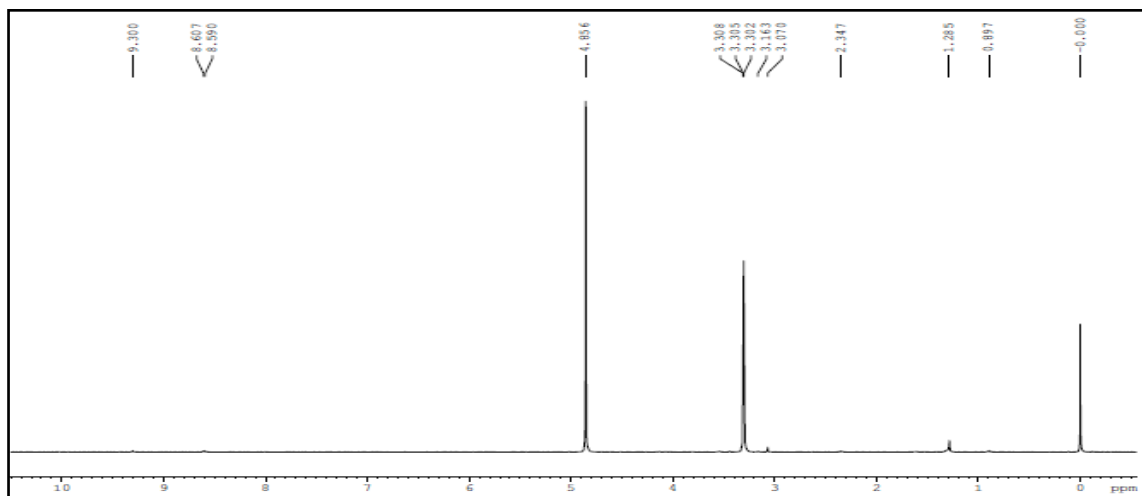


Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do complexo (13)

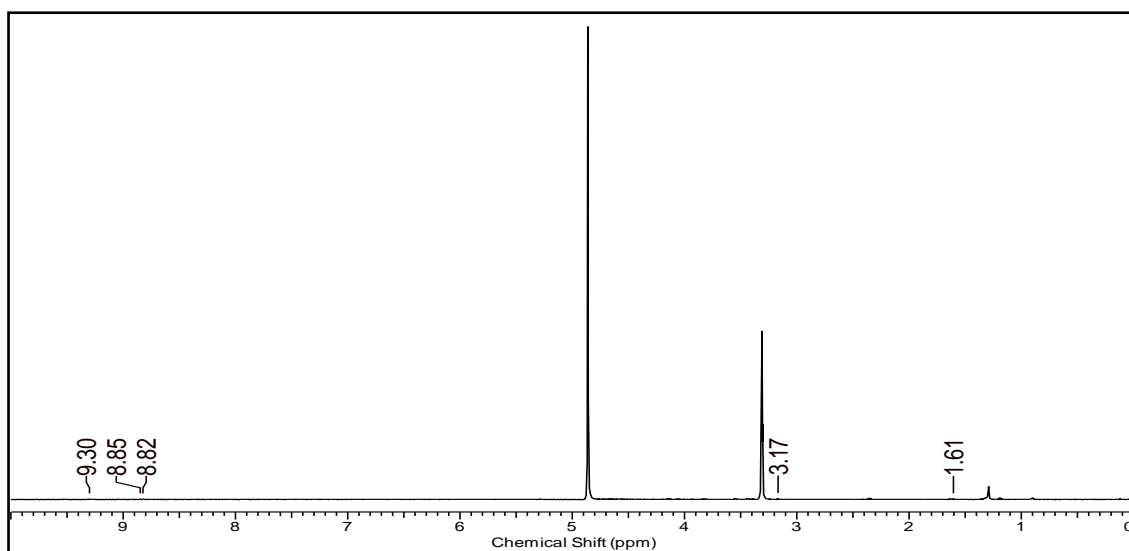


Figura 91- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do complexo (14)

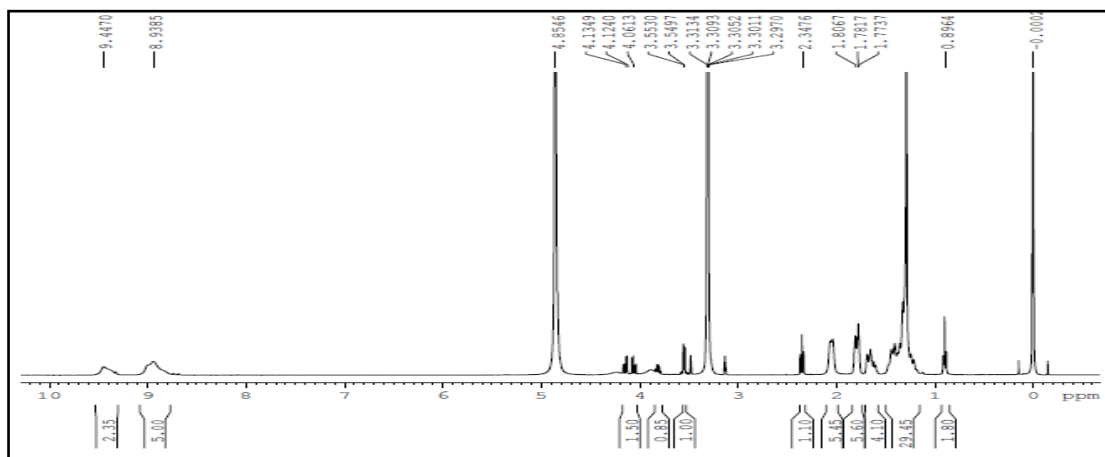


Figura 92- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do complexo (15)

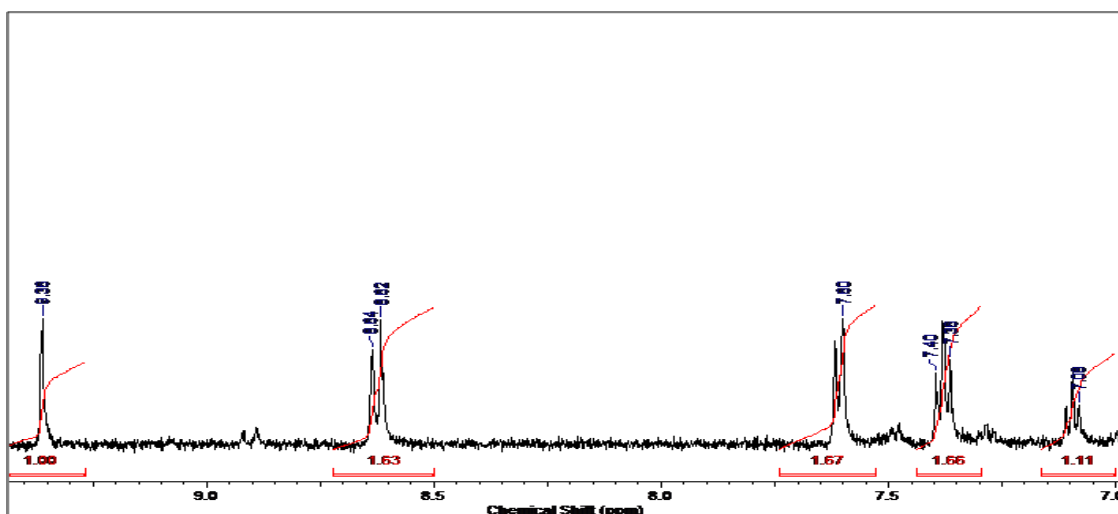


Figura 93- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto (21)

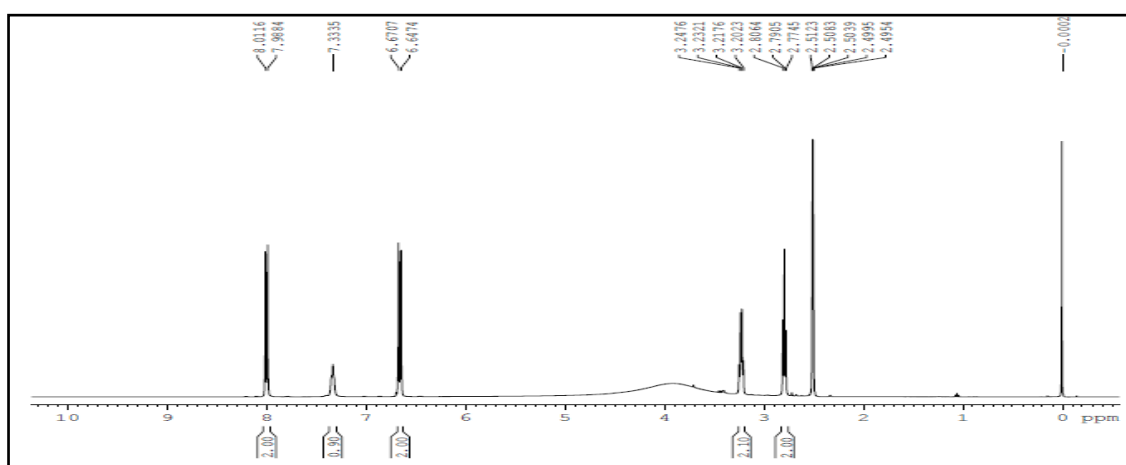


Figura 94- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto (21)

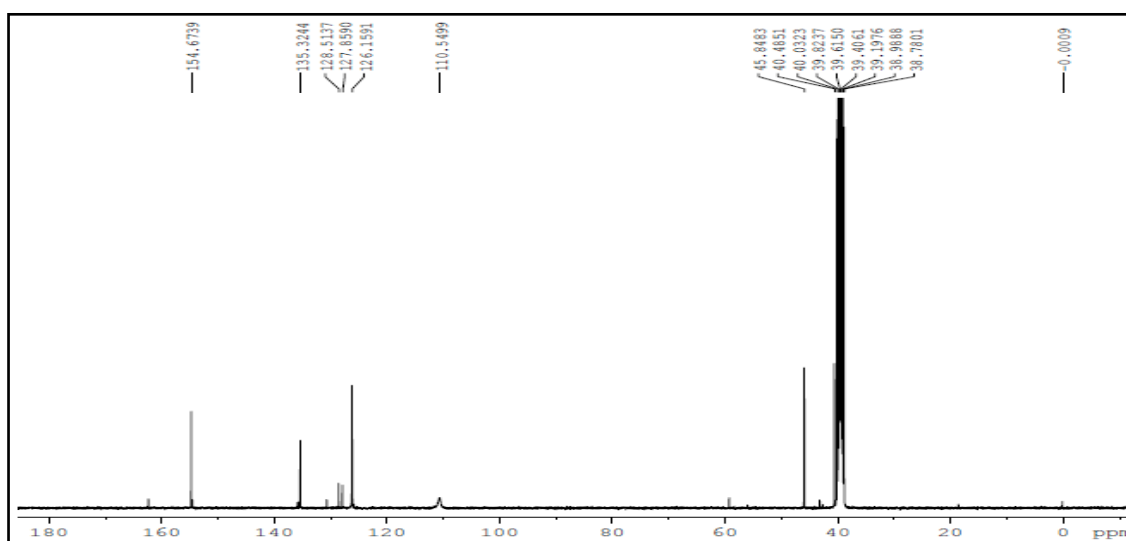


Figura 98– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**23**)

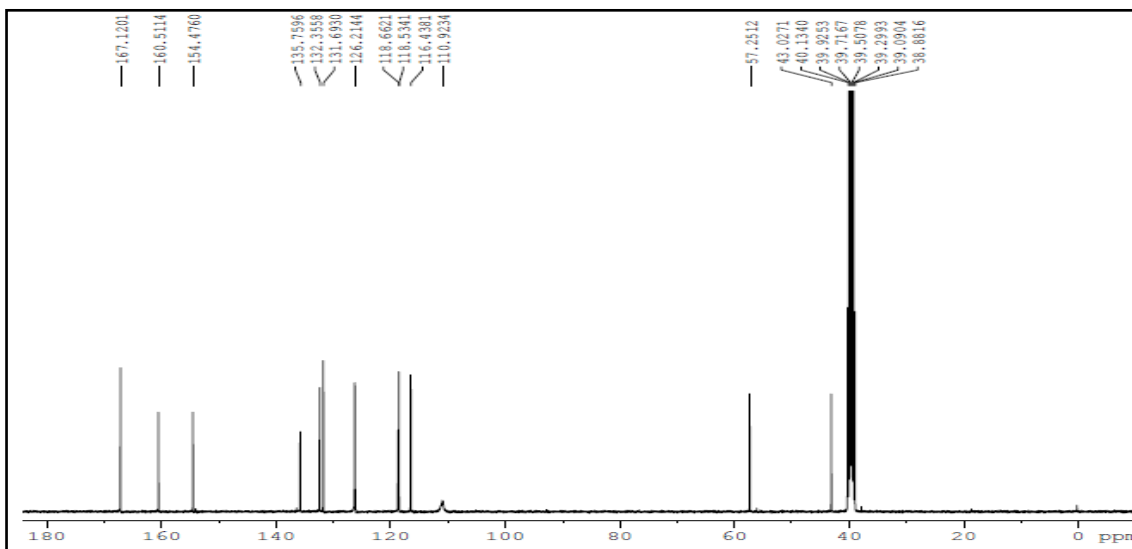


Figura 99– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**24**)

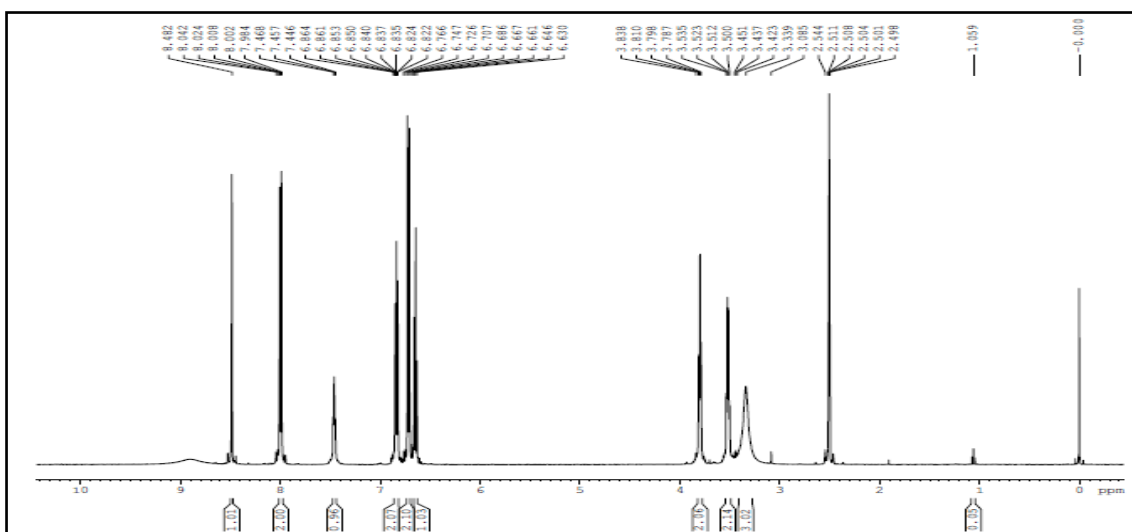


Figura 100– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**24**)

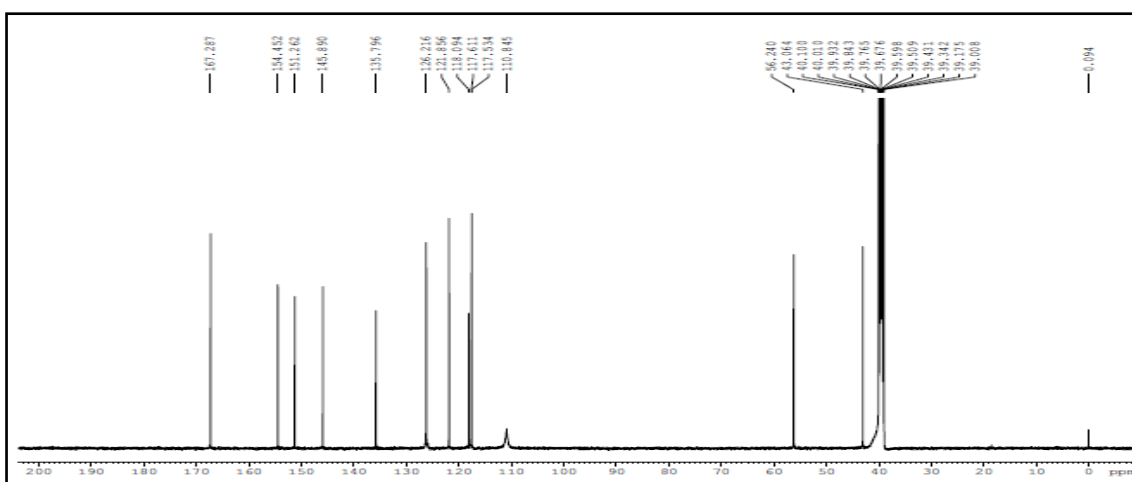


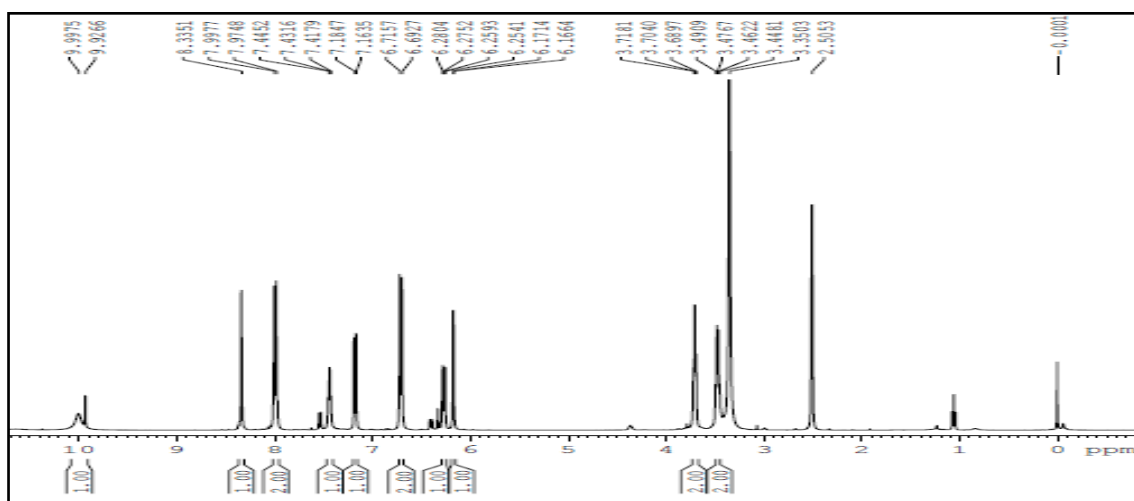
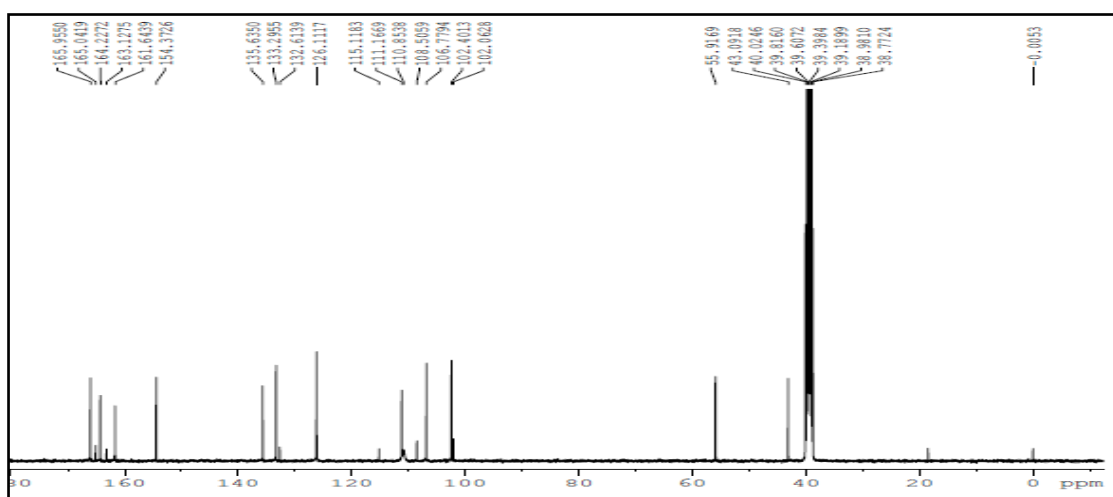
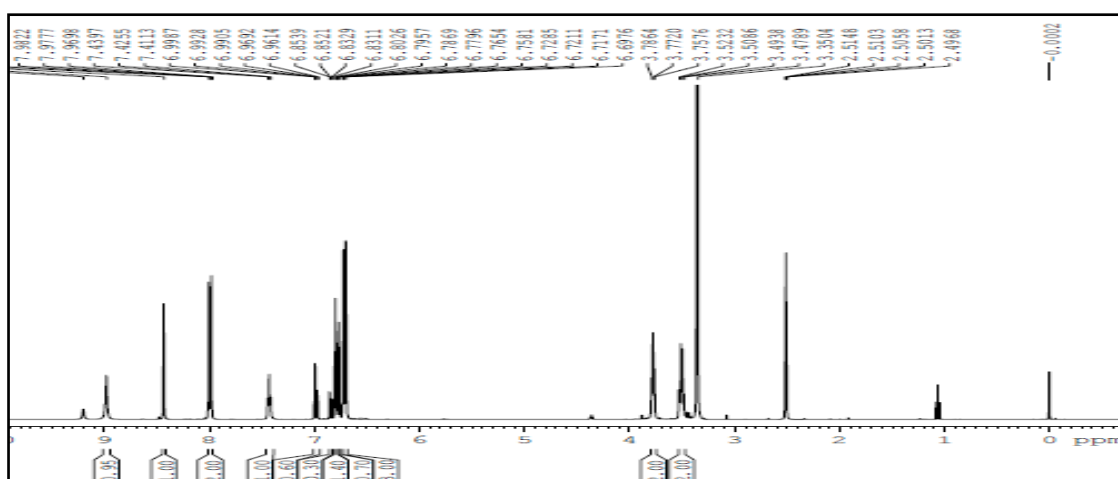
Figura 101– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**25**)Figura 102– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**25**)Figura 103– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**26**)

Figura 104– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (26)

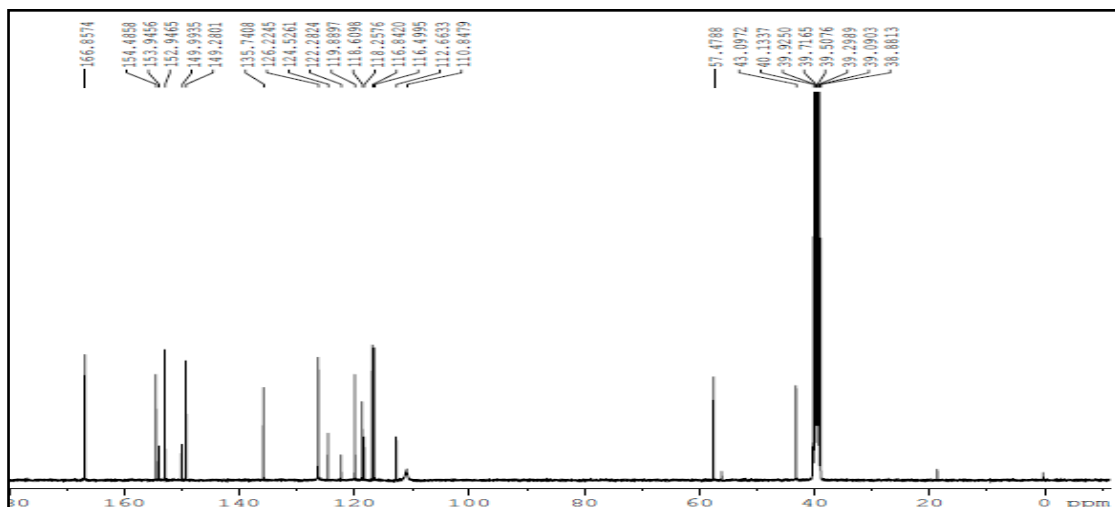


Figura 105– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (27)

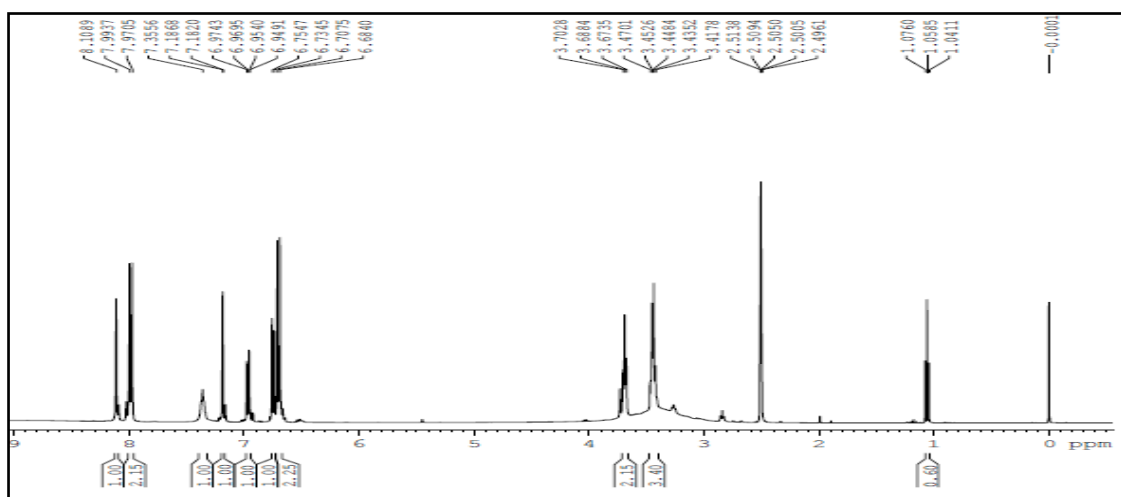


Figura 106– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (27)

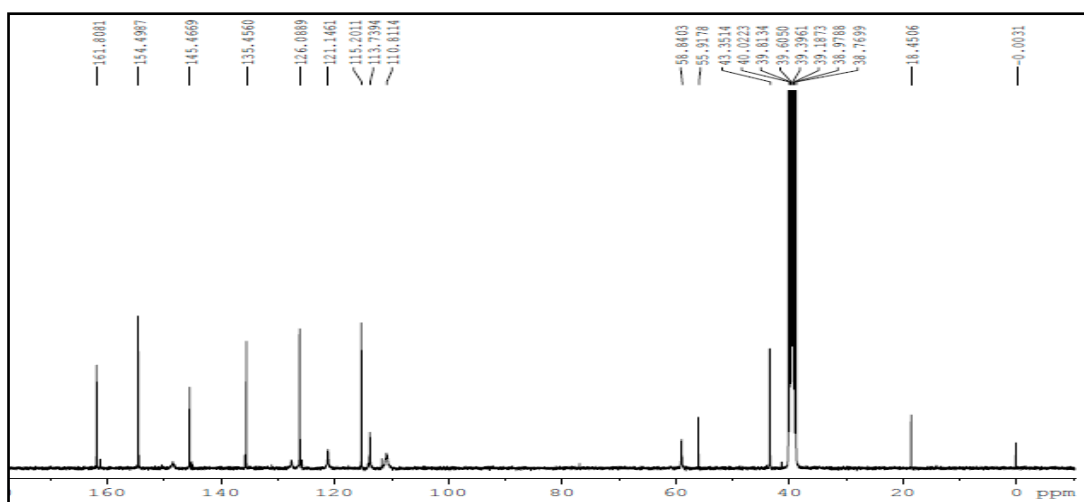


Figura 107– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (28)

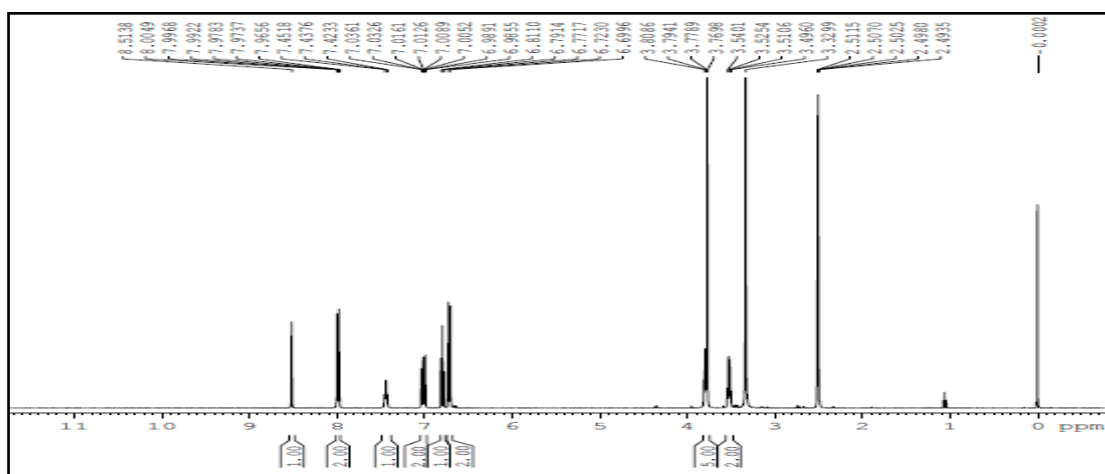


Figura 108– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (28)

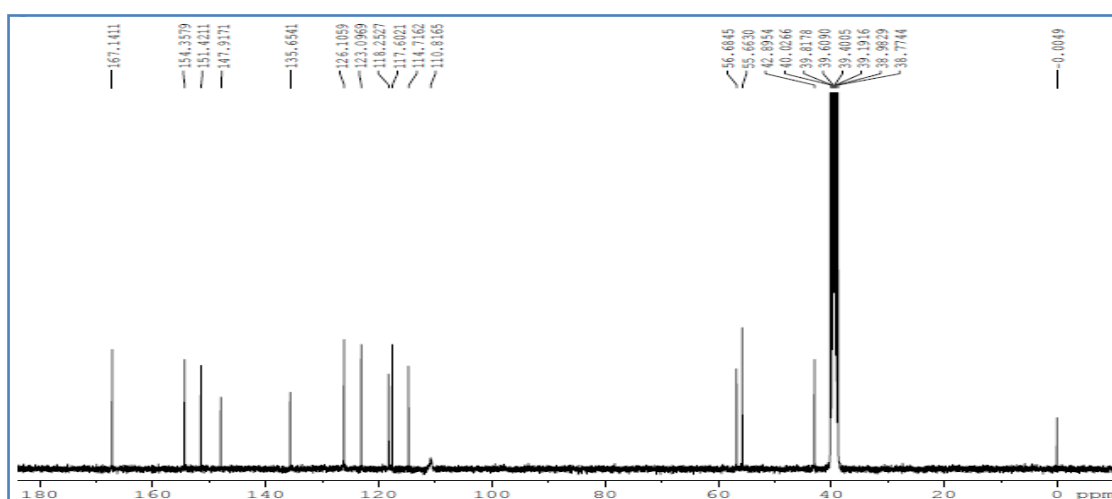


Figura 109– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (29)

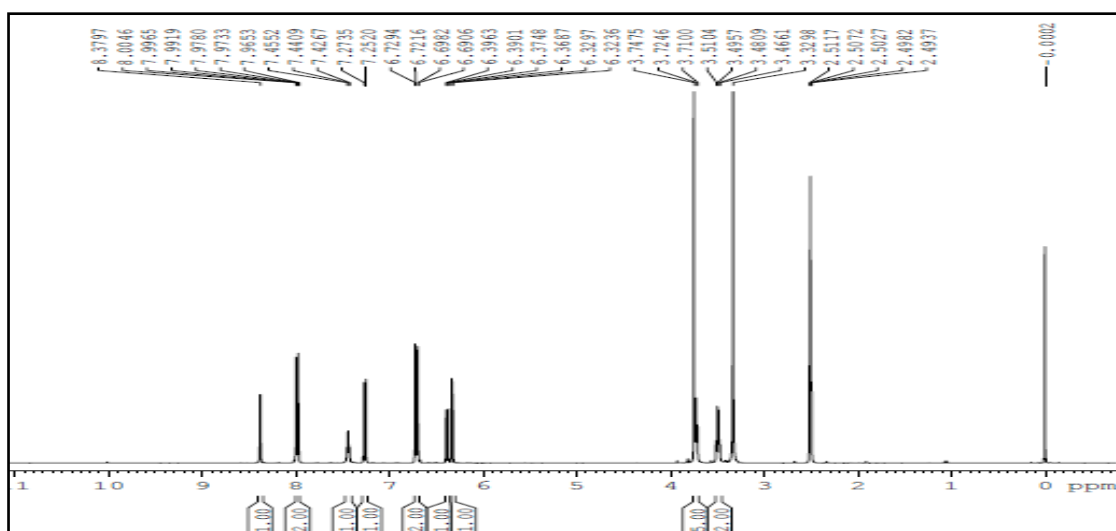


Figura 110– Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) do composto (29)

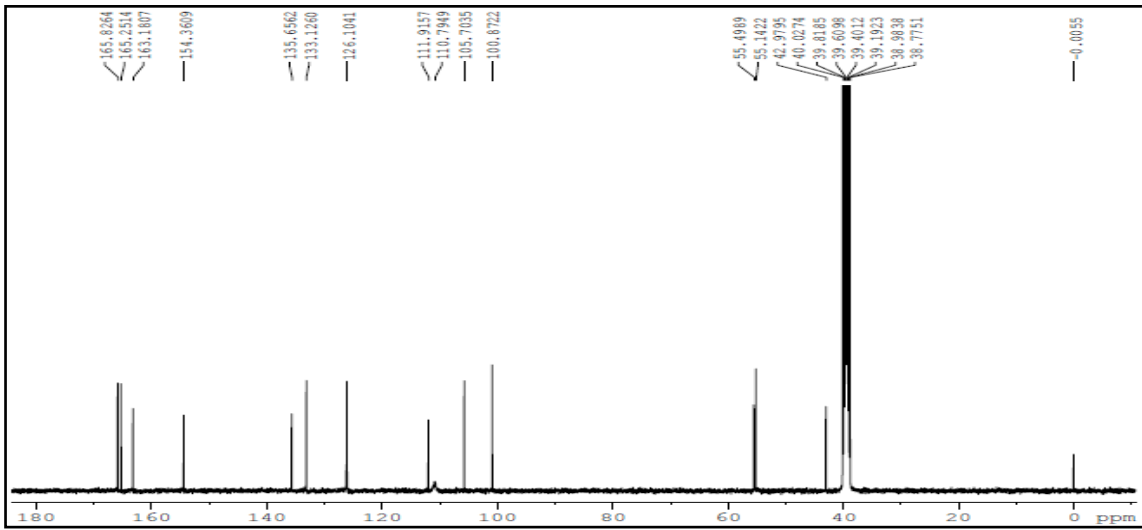


Figura 111– Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) do composto (30)

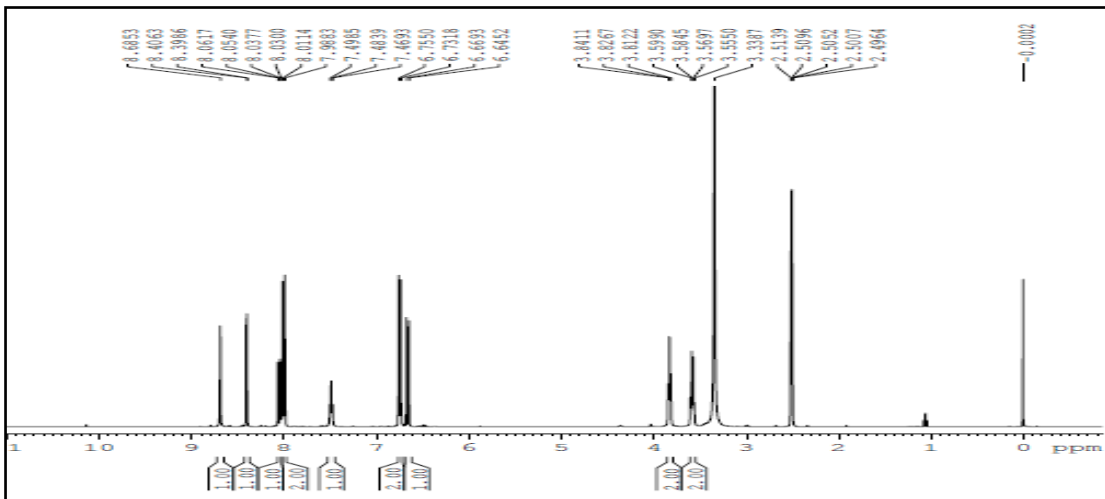


Figura 112– Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) do composto (30)

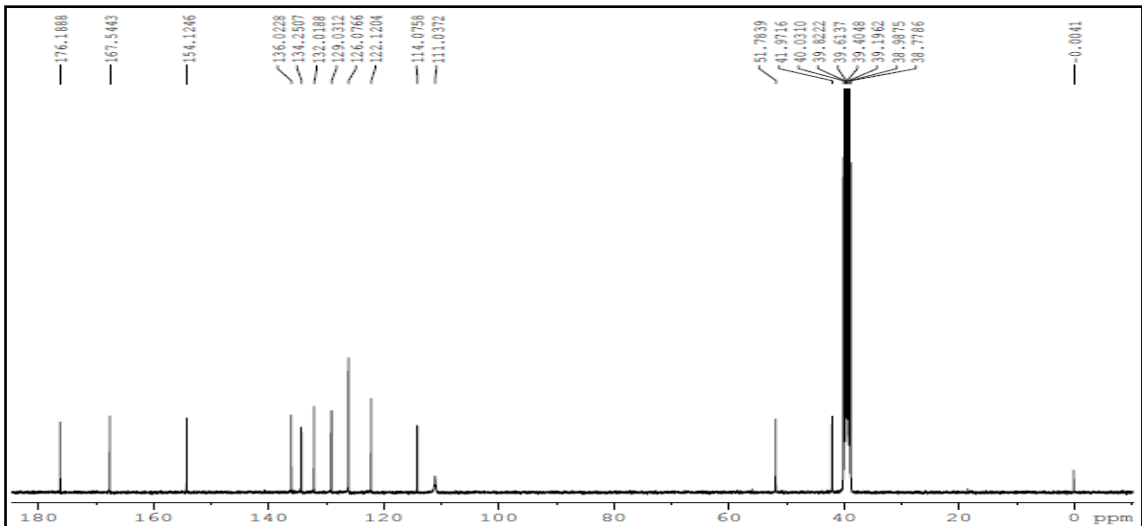


Figura 113– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**31**)

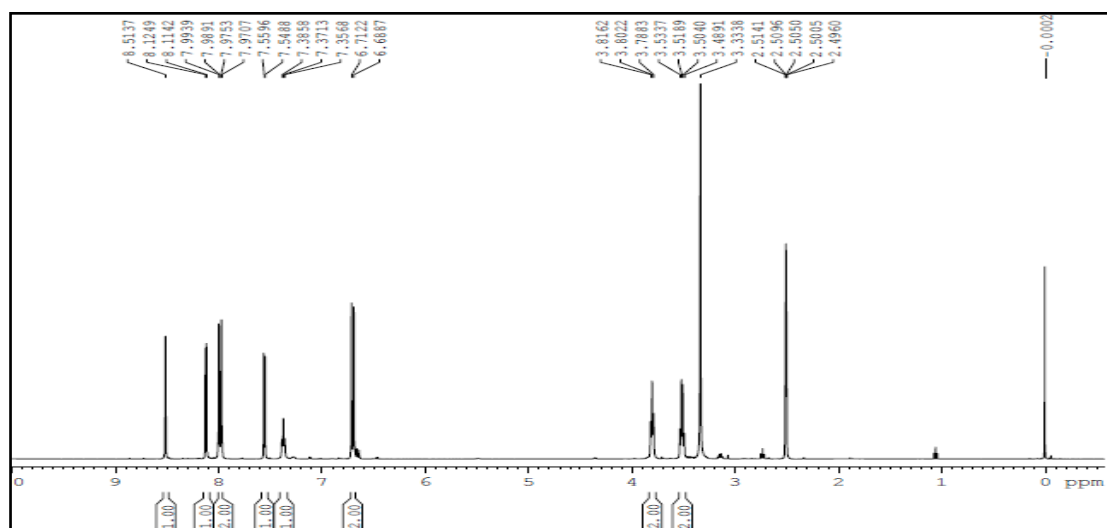


Figura 114– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**31**)

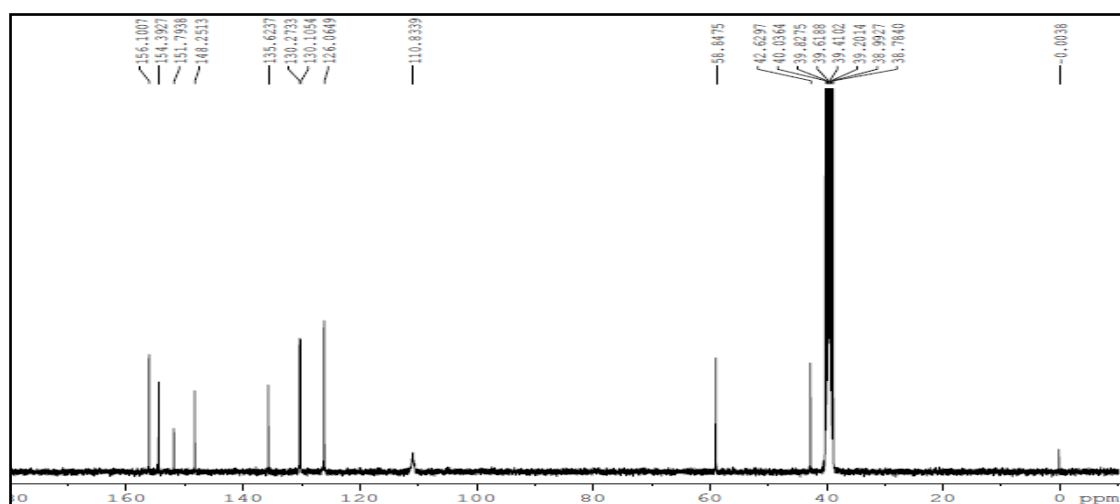


Figura 115– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**32**)

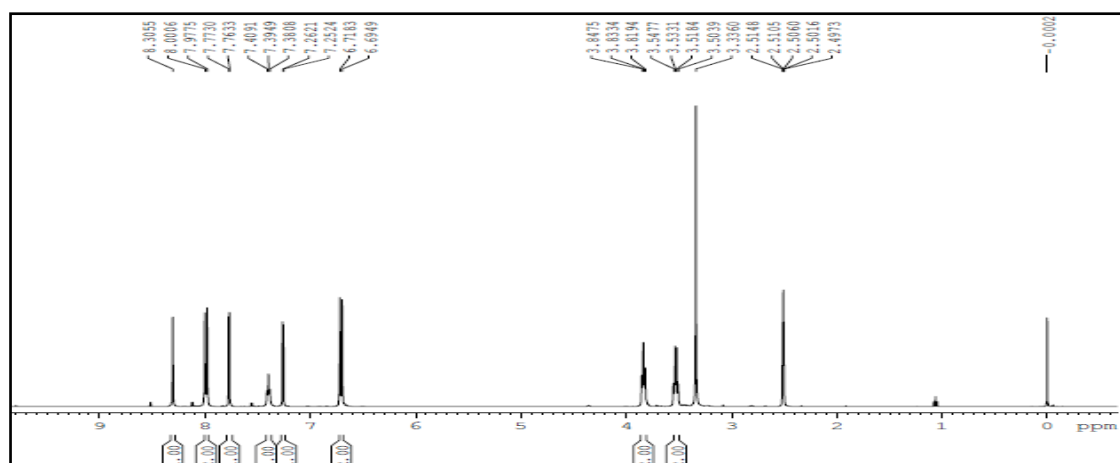
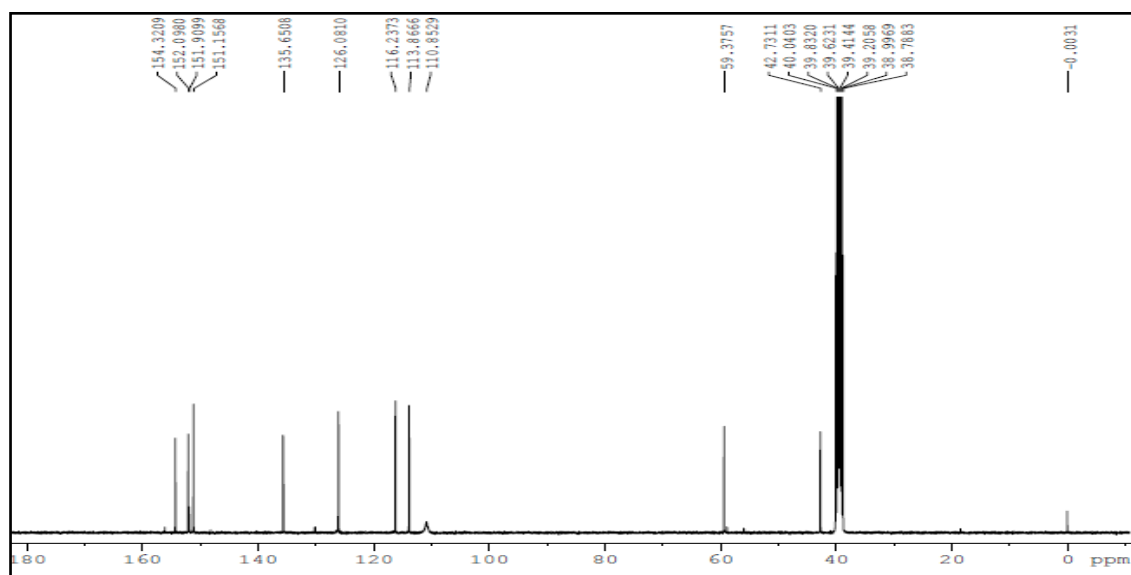


Figura 116– Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto (**32**)

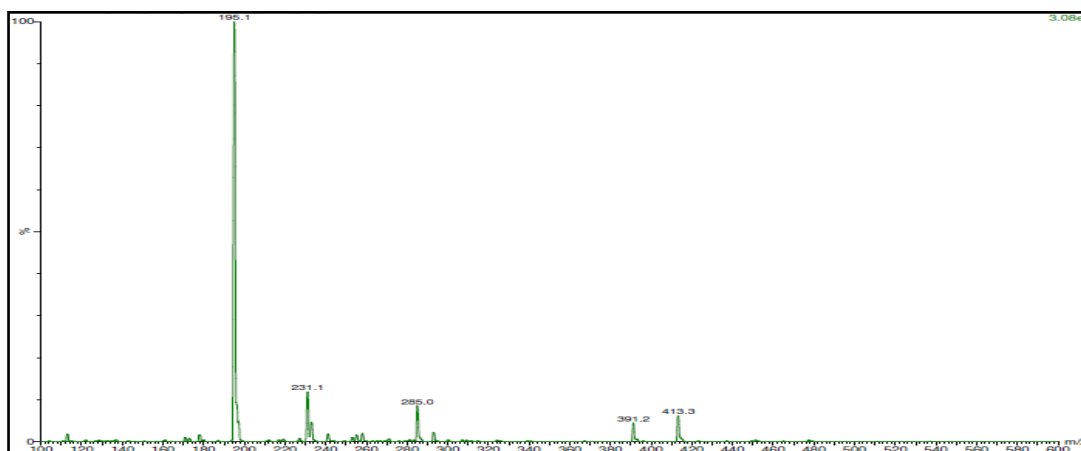
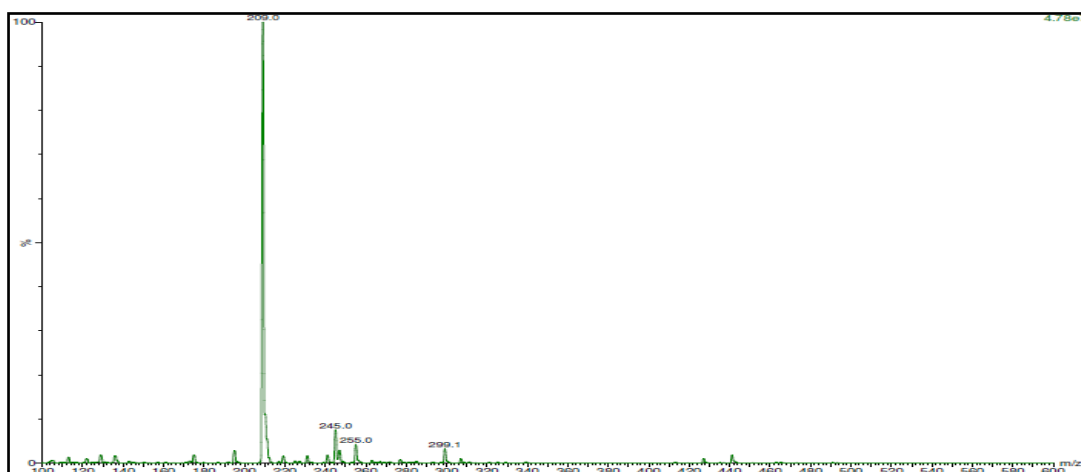
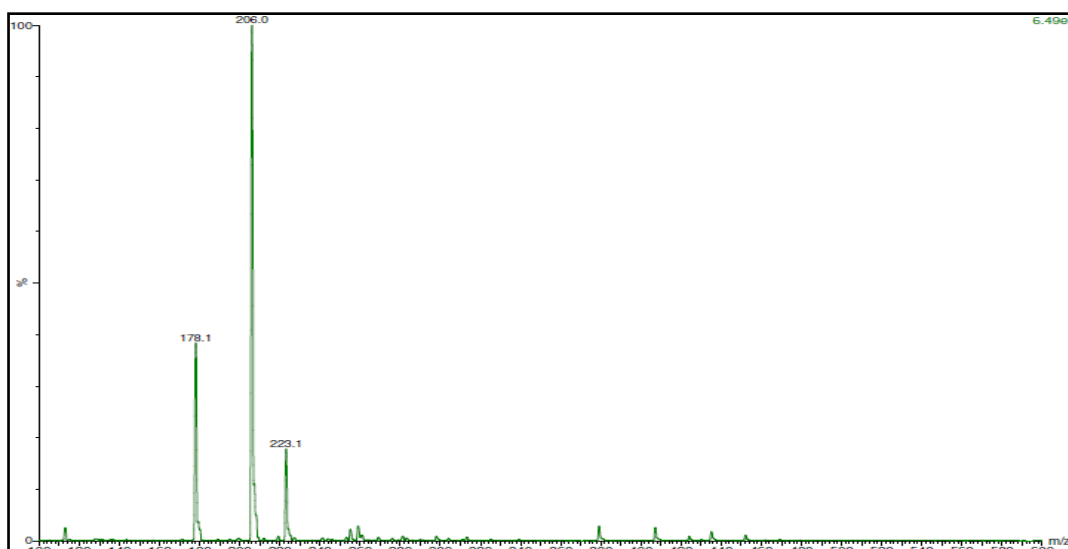
APÊNDICE D – Espectros de Massas (ESI-MS)Figura 117– Espectro de massas (MeOH) do composto **(1)**, obtido no modo negativo.Figura 118– Espectro de massas (MeOH) do composto **(2)**, obtido no modo negativo.Figura 119– Espectro de massas (MeOH) do composto **(3)**, obtido no modo negativo.

Figura 120– Espectro de massas (MeOH) do composto (4), obtido no modo negativo

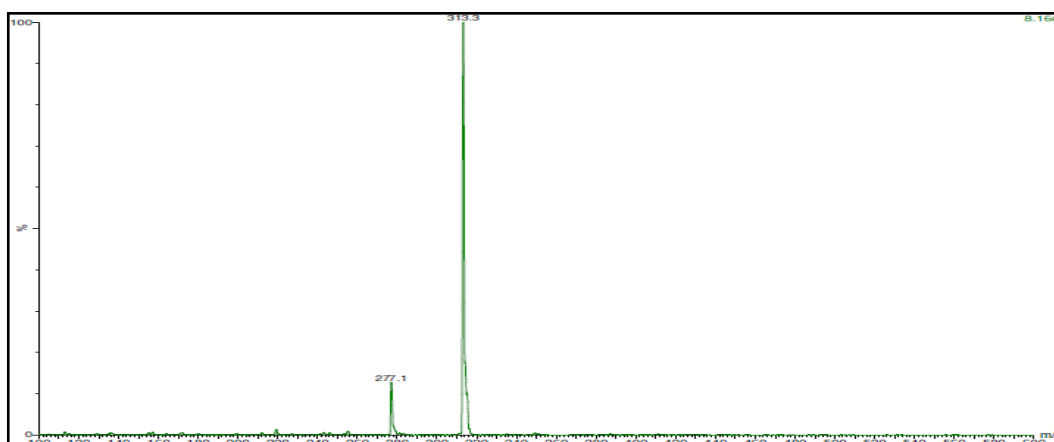


Figura 121– Espectro de massas (MeOH) do composto (5), obtido no modo negativo

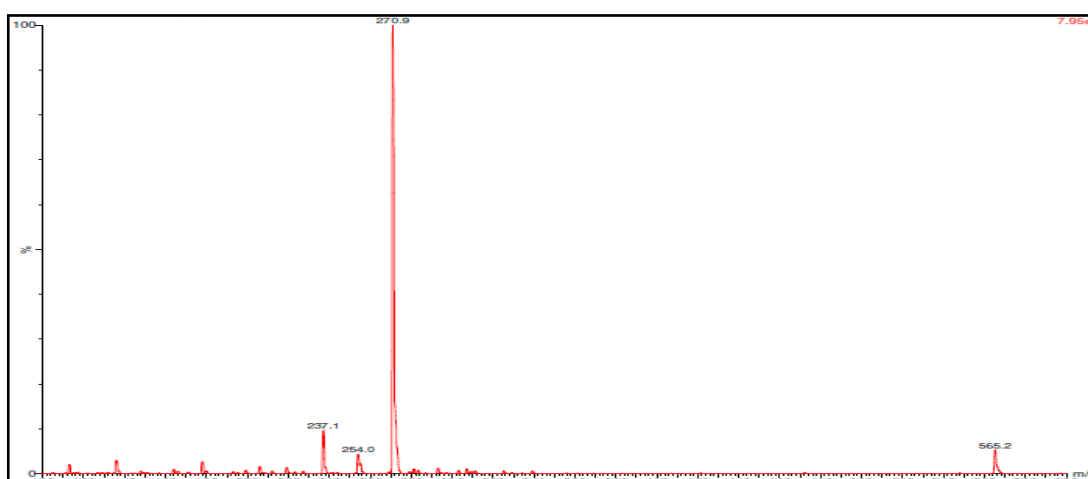


Figura 122– Espectro de massas (MeOH) do complexo (6), obtido no modo positivo

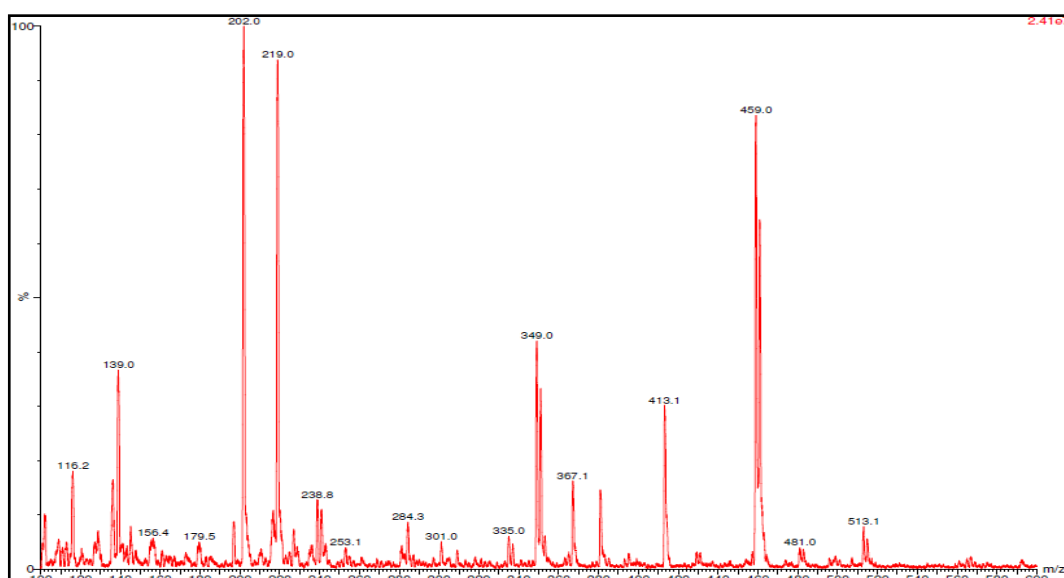


Figura 123– Espectro de massas (MeOH) do complexo (7), obtido no modo positivo

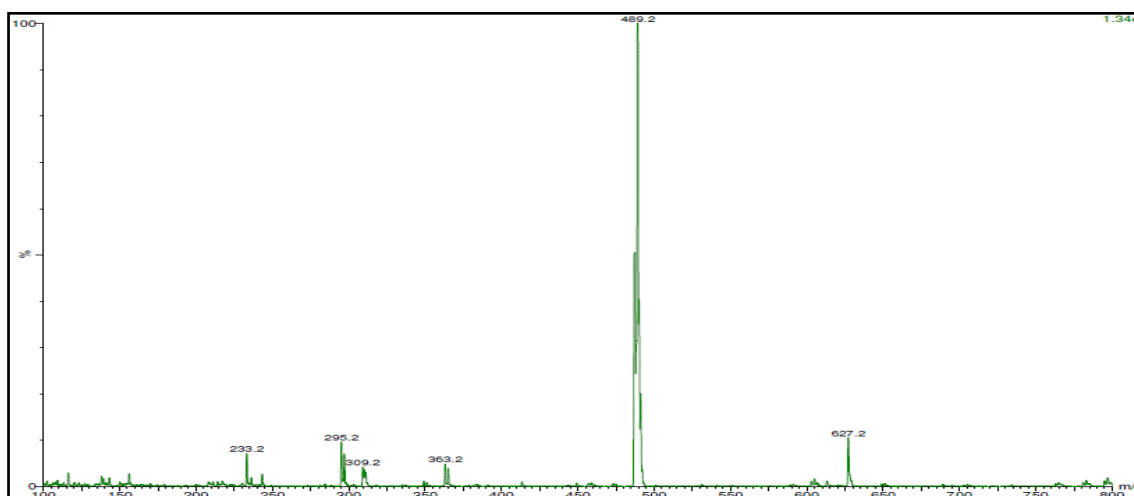


Figura 124– Espectro de massas (MeOH) do complexo (8), obtido no modo positivo

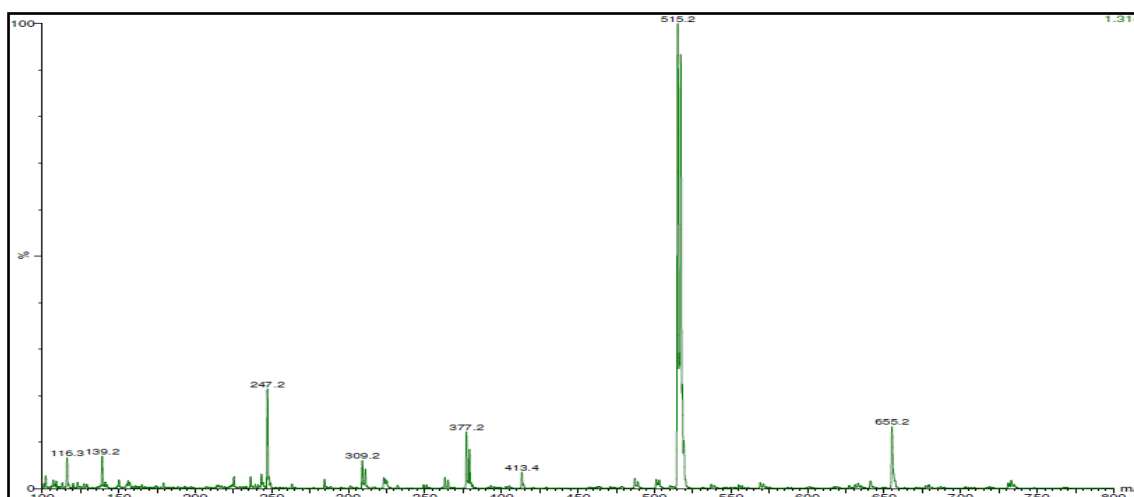


Figura 125– Espectro de massas (MeOH) do complexo (9), obtido no modo positivo

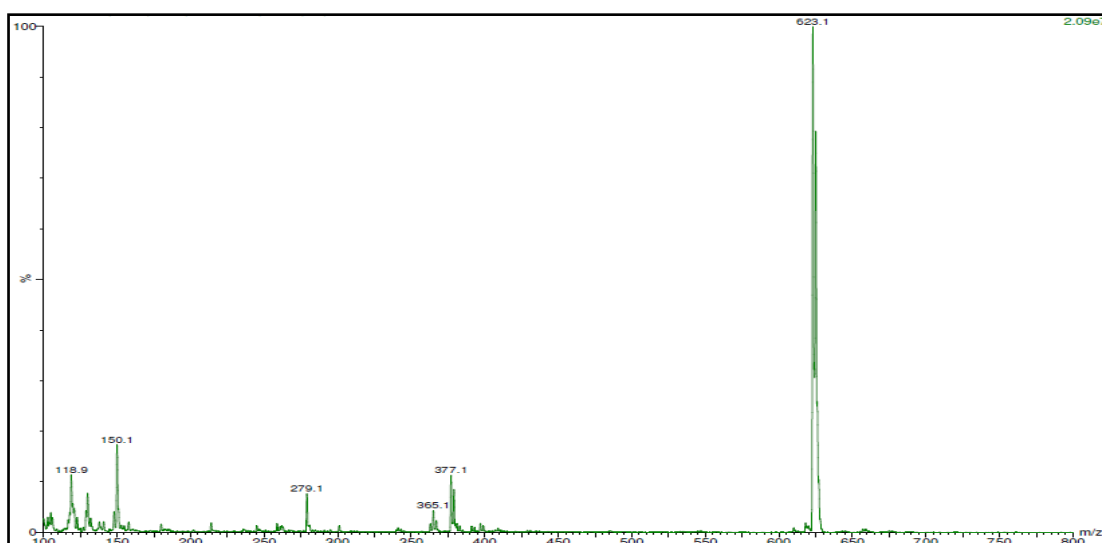


Figura 126– Espectro de massas (MeOH) do complexo (10), obtido no modo positivo

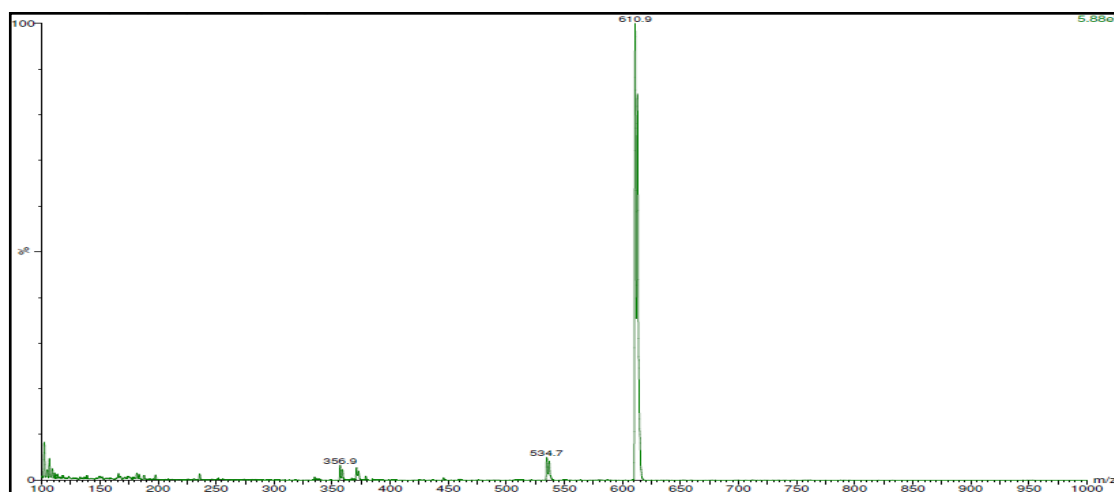


Figura 127– Espectro de massas (MeOH) do complexo (11), obtido no modo negativo

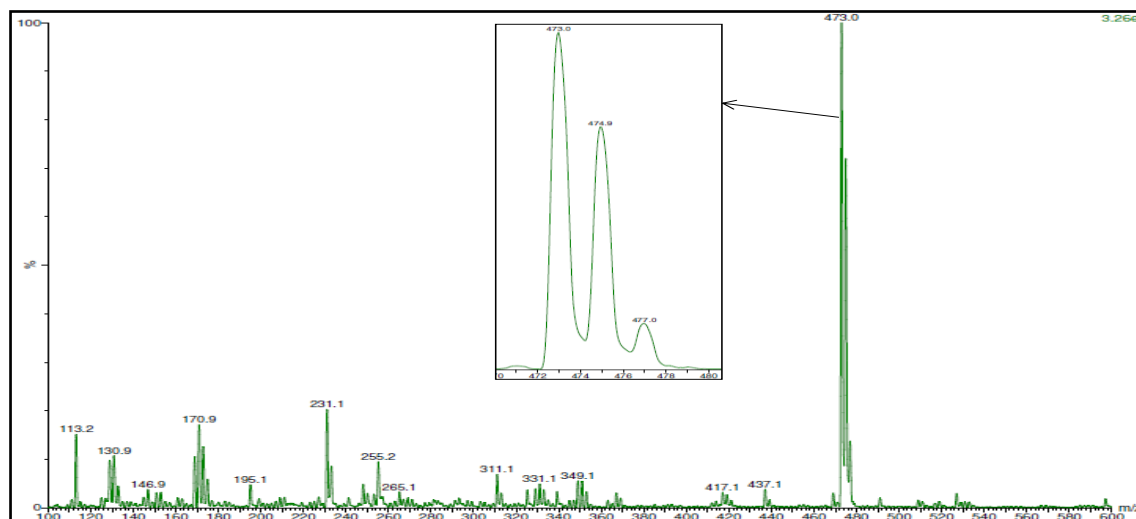


Figura 128– Espectro de massas (MeOH) do complexo (12), obtido no modo positivo

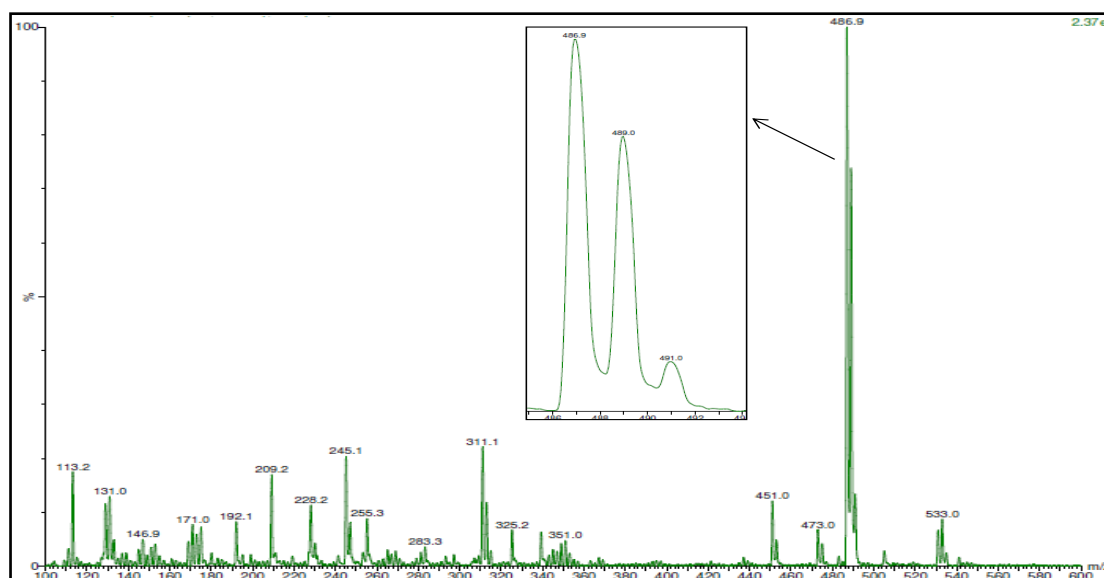


Figura 129– Espectro de massas (MeOH) do complexo (13), obtido no modo positivo

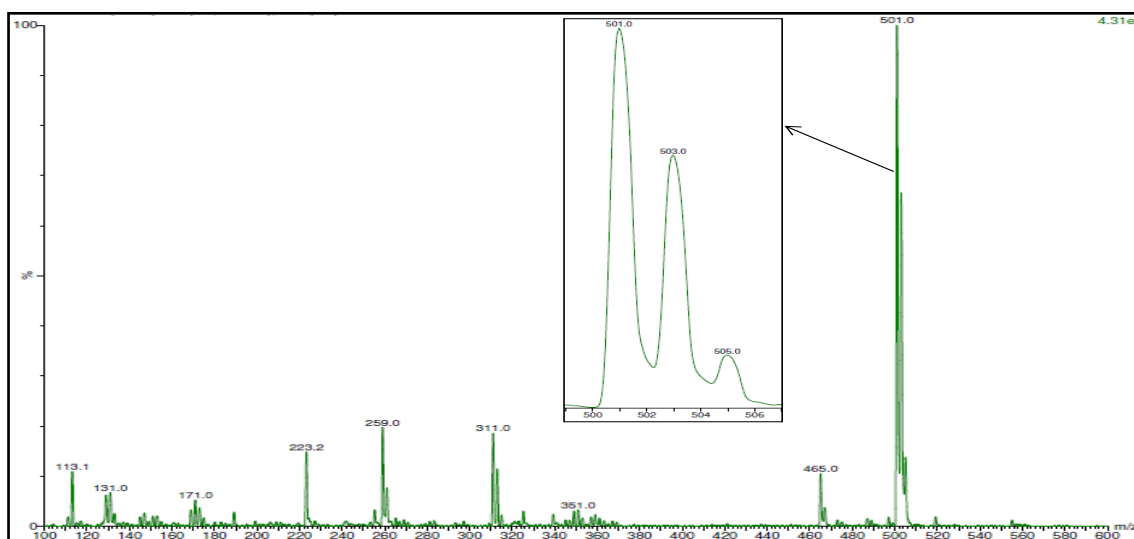


Figura 130– Espectro de massas (MeOH) do complexo (14), obtido no modo positivo

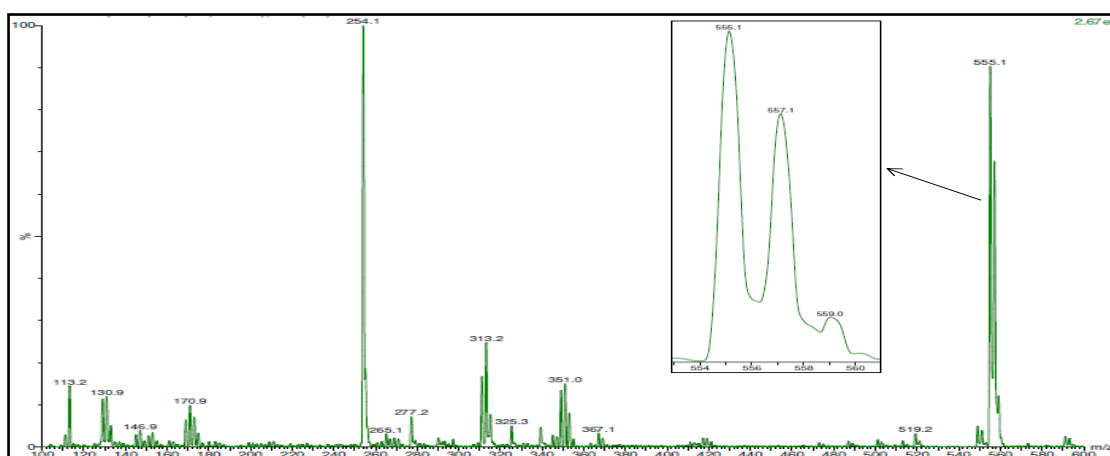


Figura 131– Espectro de massas (MeOH) do complexo (15), obtido no modo positivo

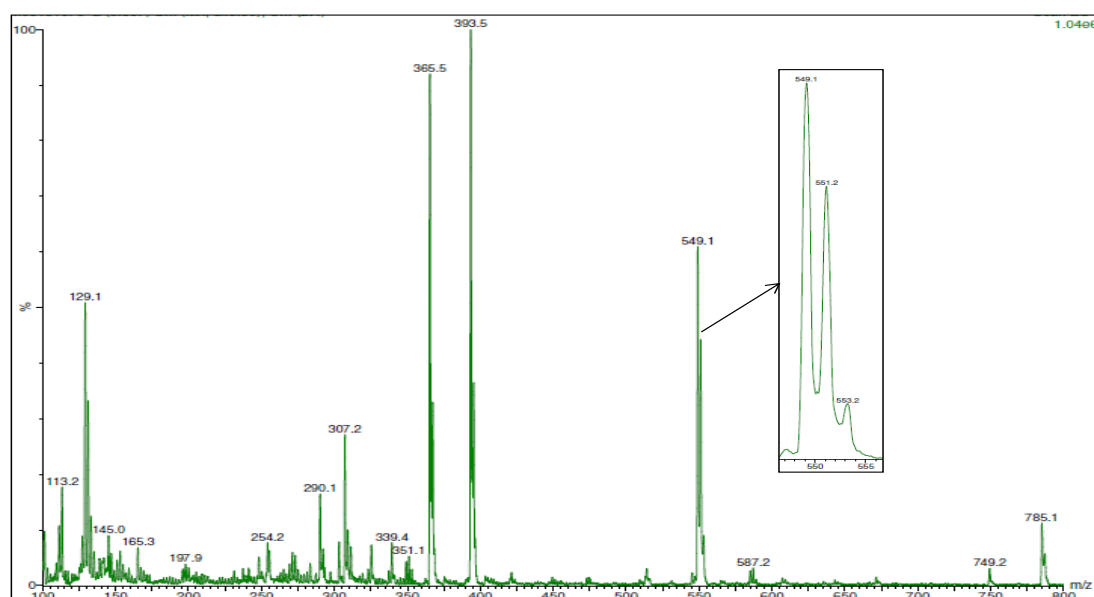


Figura 132– Espectro de massas (MeOH) do complexo (16), obtido no modo positivo

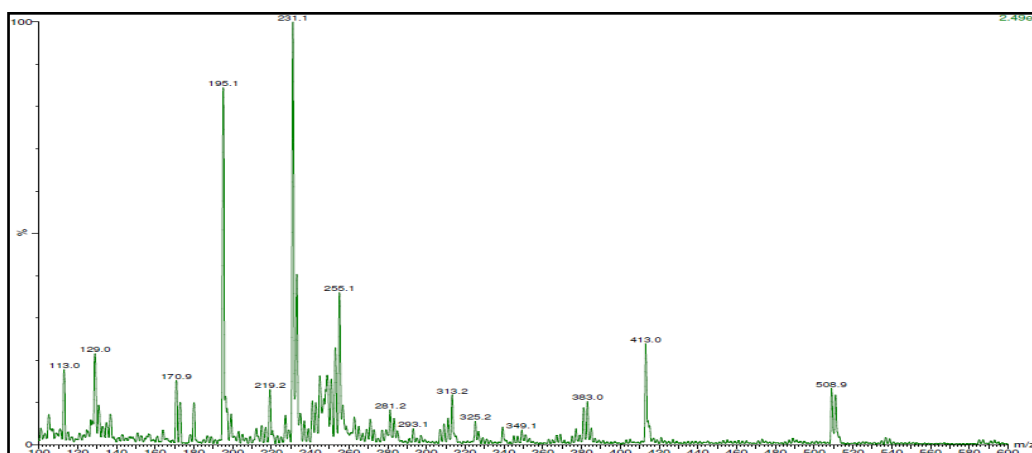


Figura 133– Espectro de massas (MeOH) do complexo (17), obtido no modo positivo

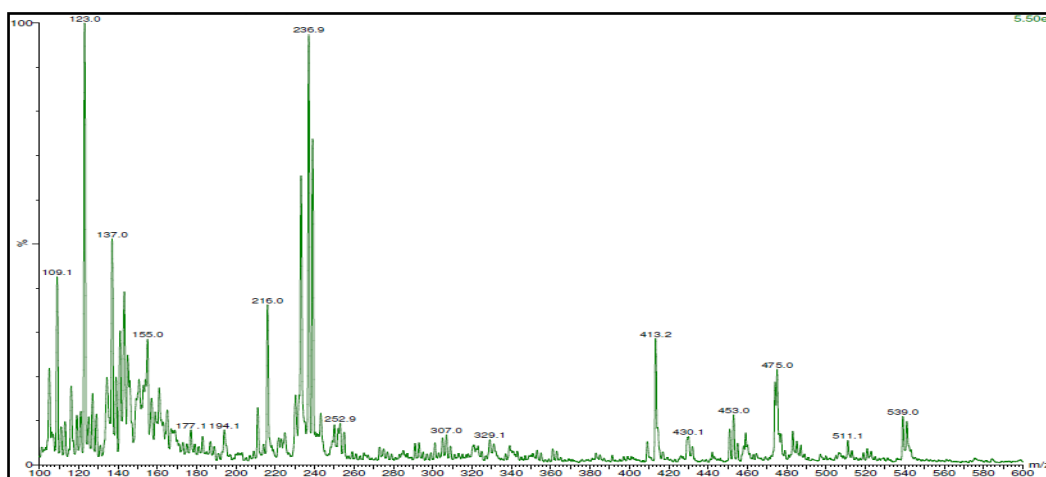


Figura 134– Espectro de massas (MeOH) do complexo (18), obtido no modo positivo

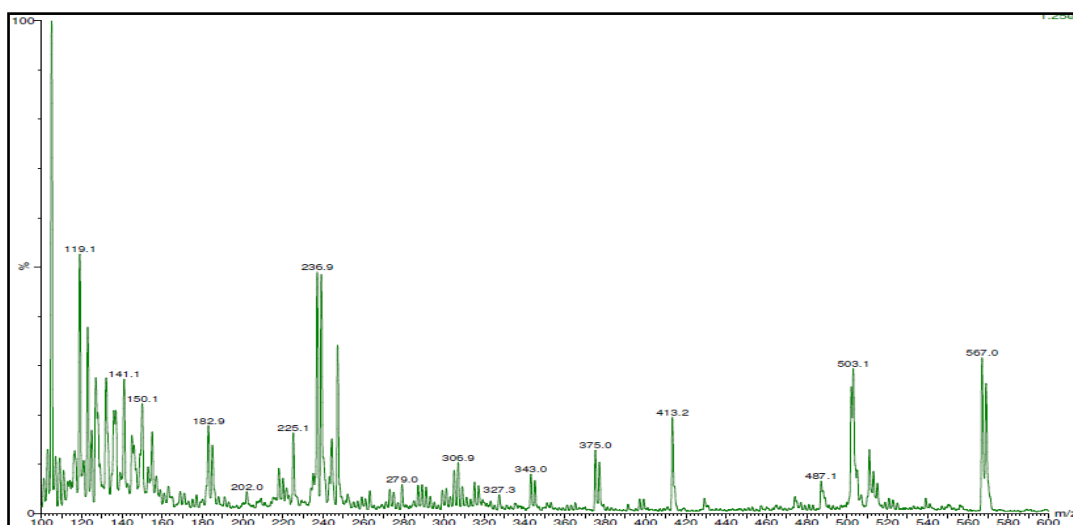


Figura 135– Espectro de massas (MeOH) do complexo (19), obtido no modo positivo

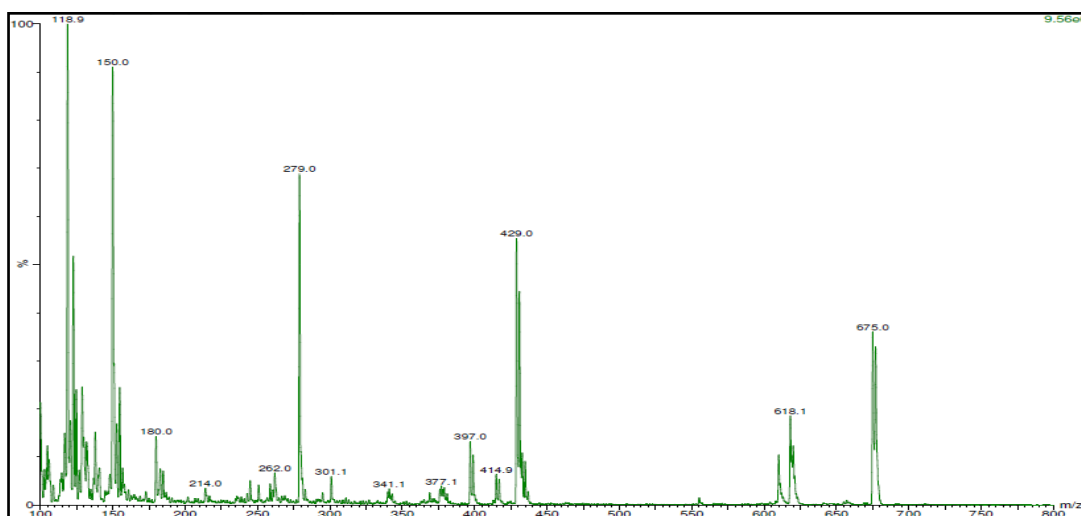


Figura 136– Espectro de massas (MeOH) do composto (20), obtido no modo positivo

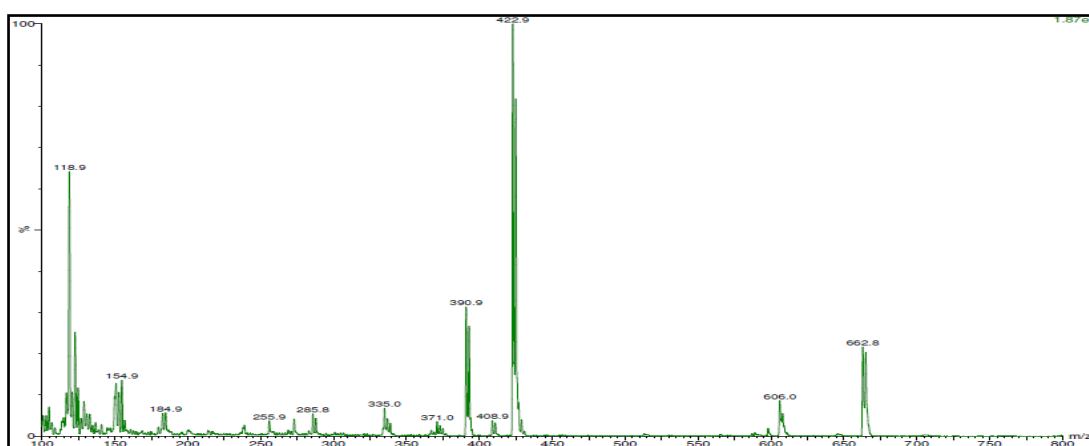


Figura 137– Espectro de massas (MeOH) do composto (21), obtido no modo positivo

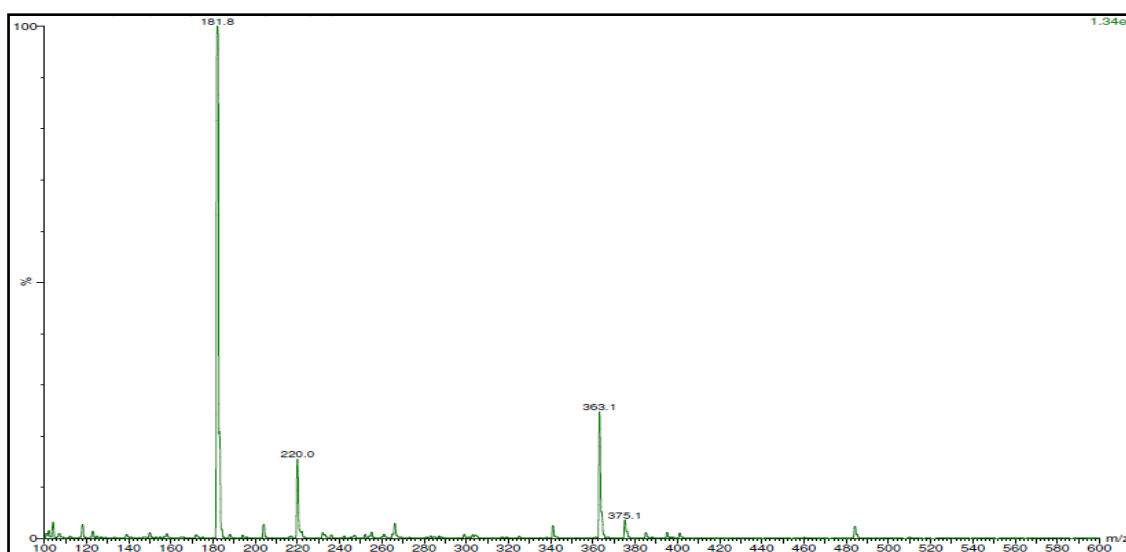


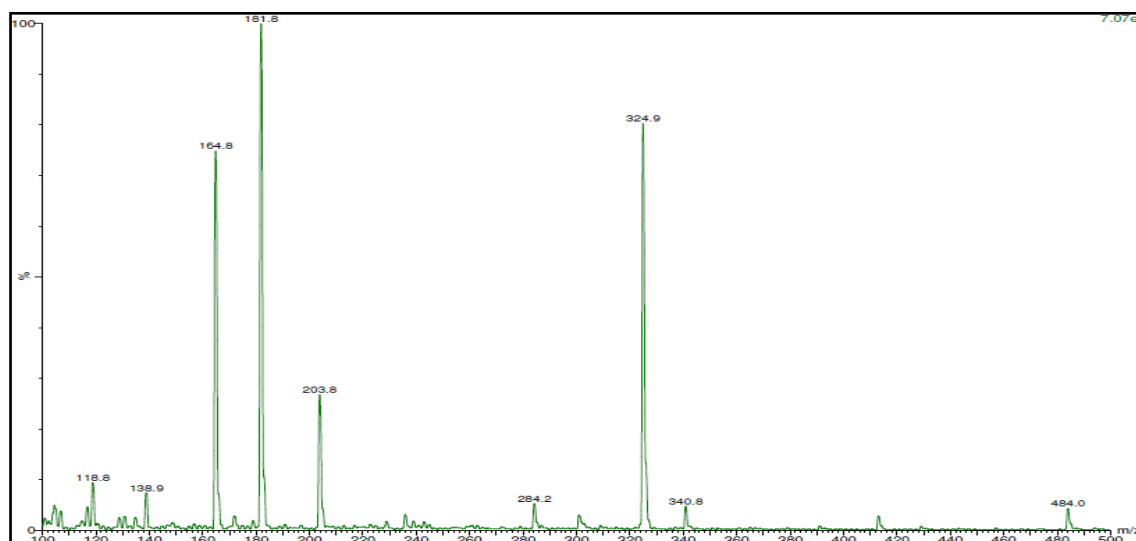
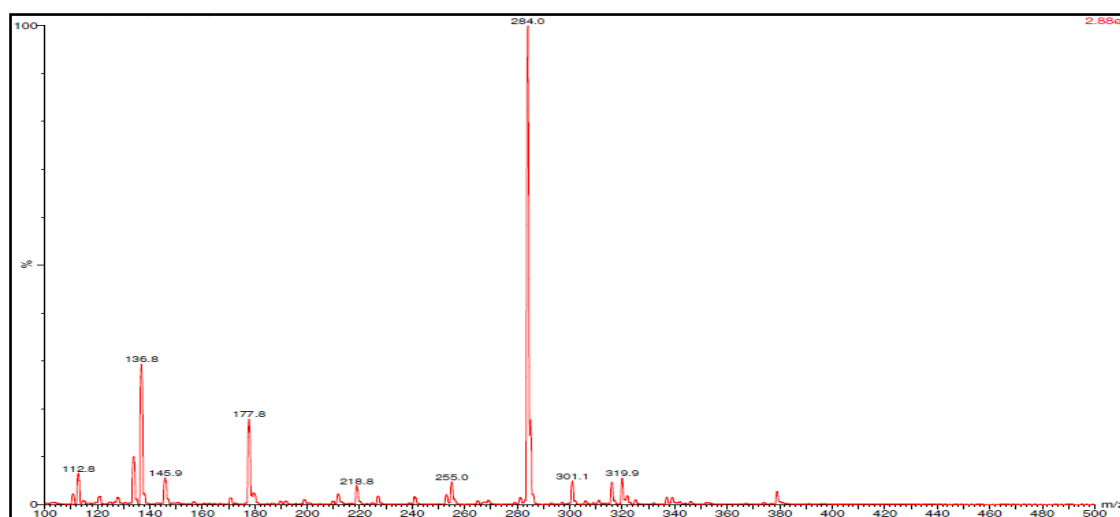
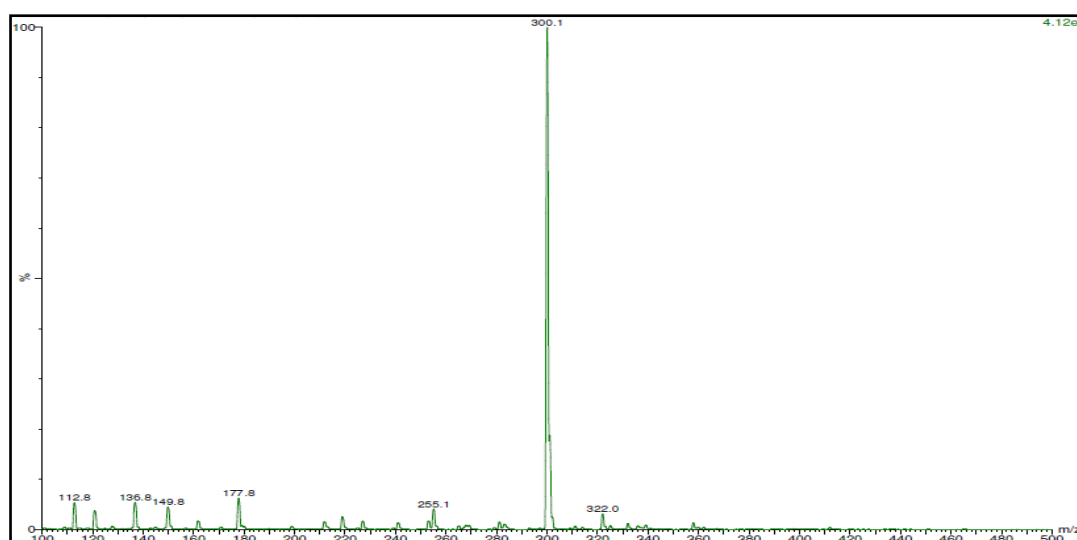
Figura 138– Espectro de massas (MeOH) do composto (**22**), obtido no modo positivoFigura 139– Espectro de massas (MeOH) do composto (**23**), obtido no modo positivoFigura 140– Espectro de massas (MeOH) do composto (**24**), obtido no modo positivo

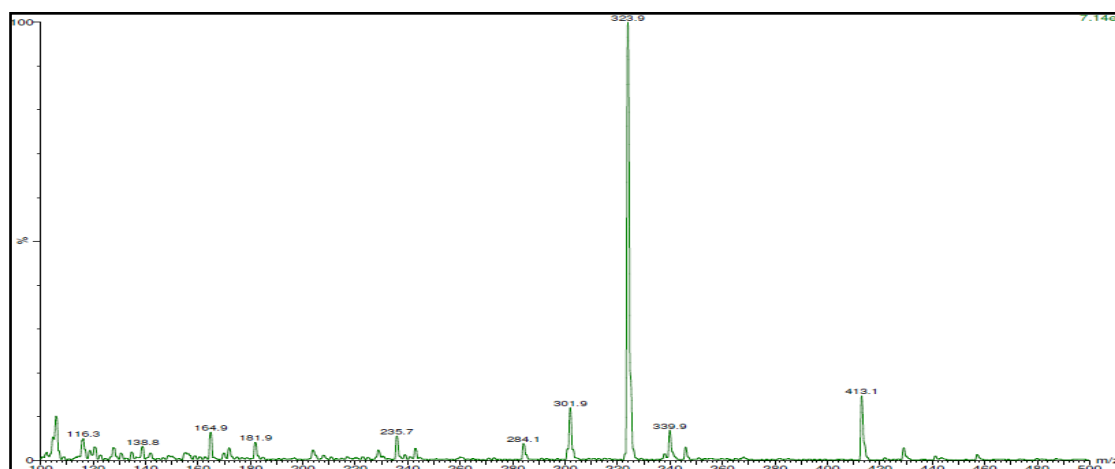
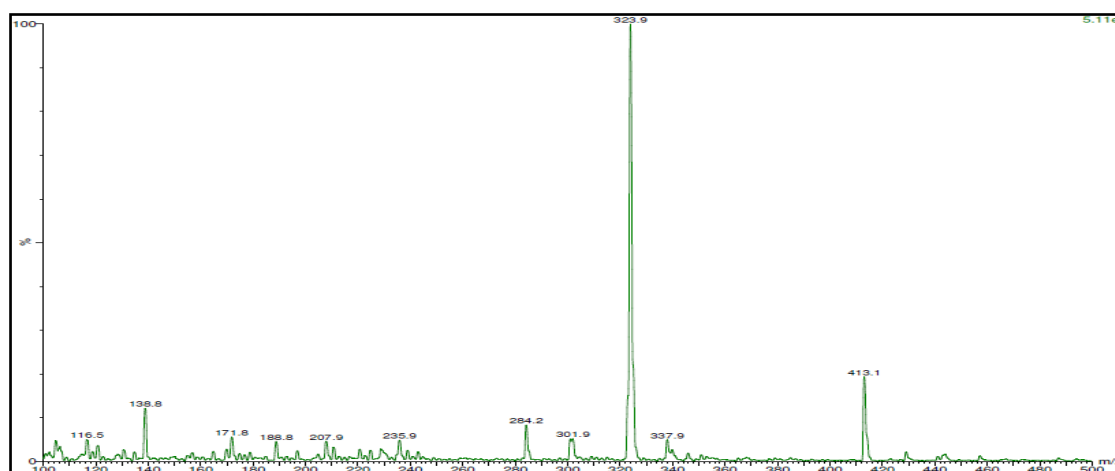
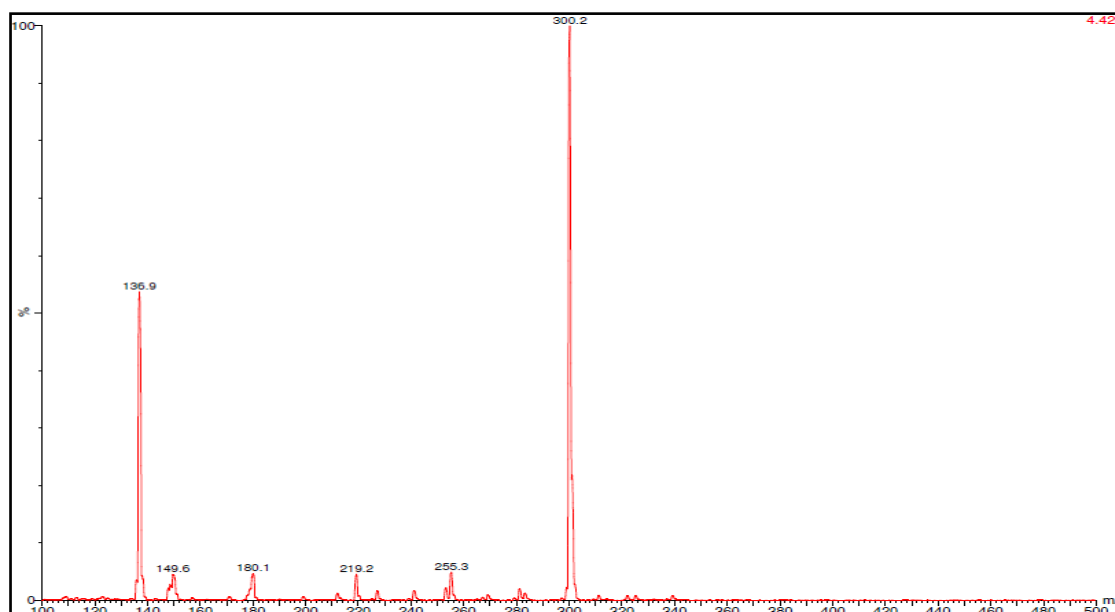
Figura 141– Espectro de massas (MeOH) do composto (**25**), obtido no modo positivoFigura 142– Espectro de massas (MeOH) do composto (**26**), obtido no modo positivoFigura 143– Espectro de massas (MeOH) do composto (**27**), obtido no modo positivo

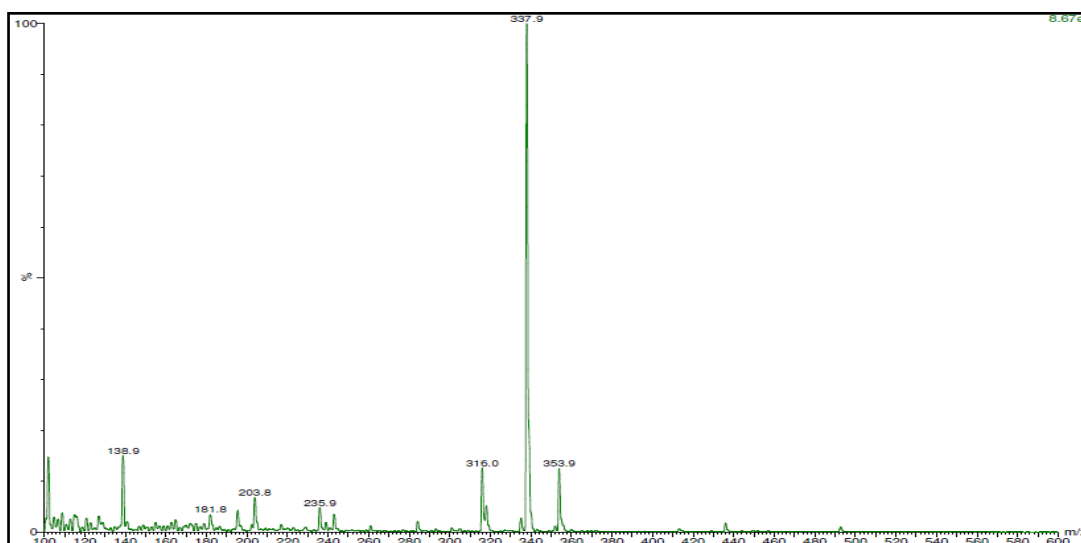
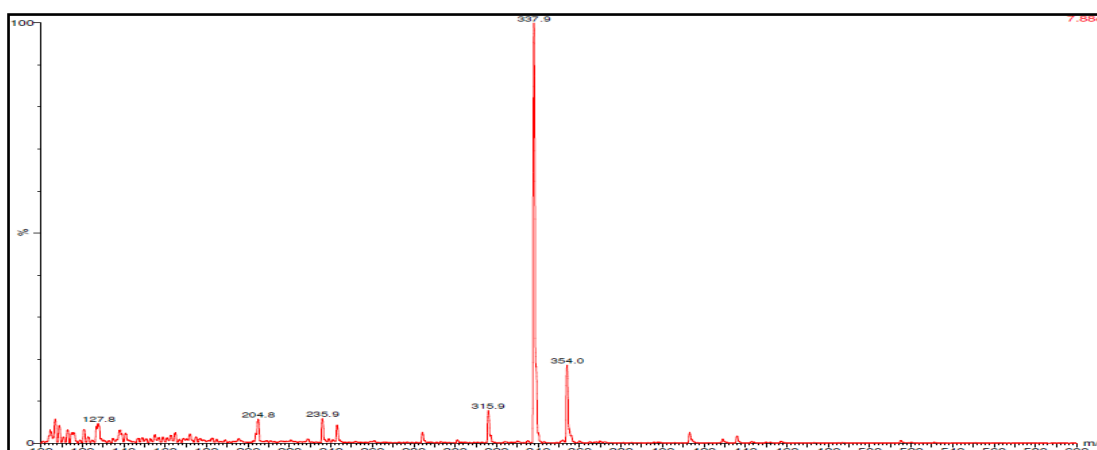
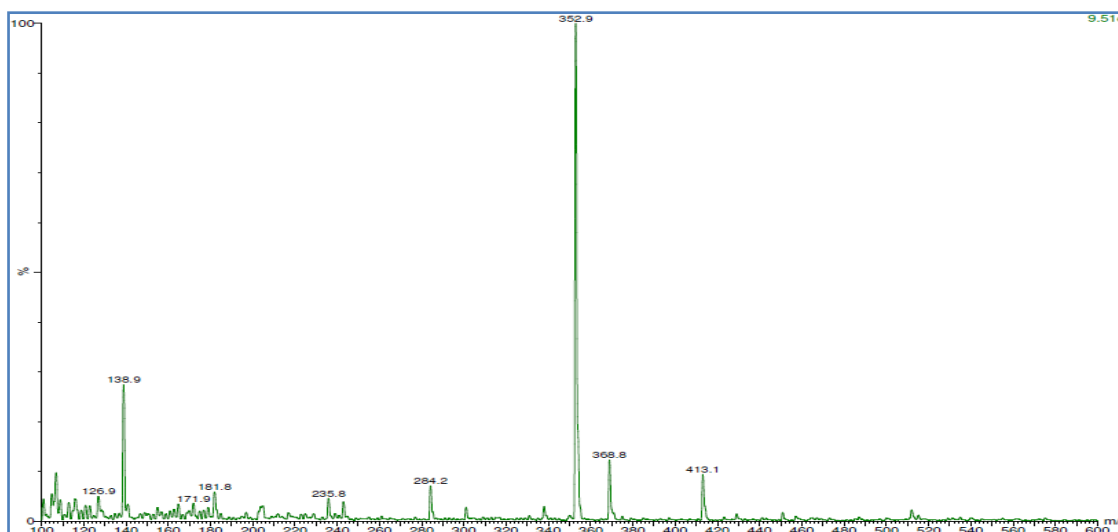
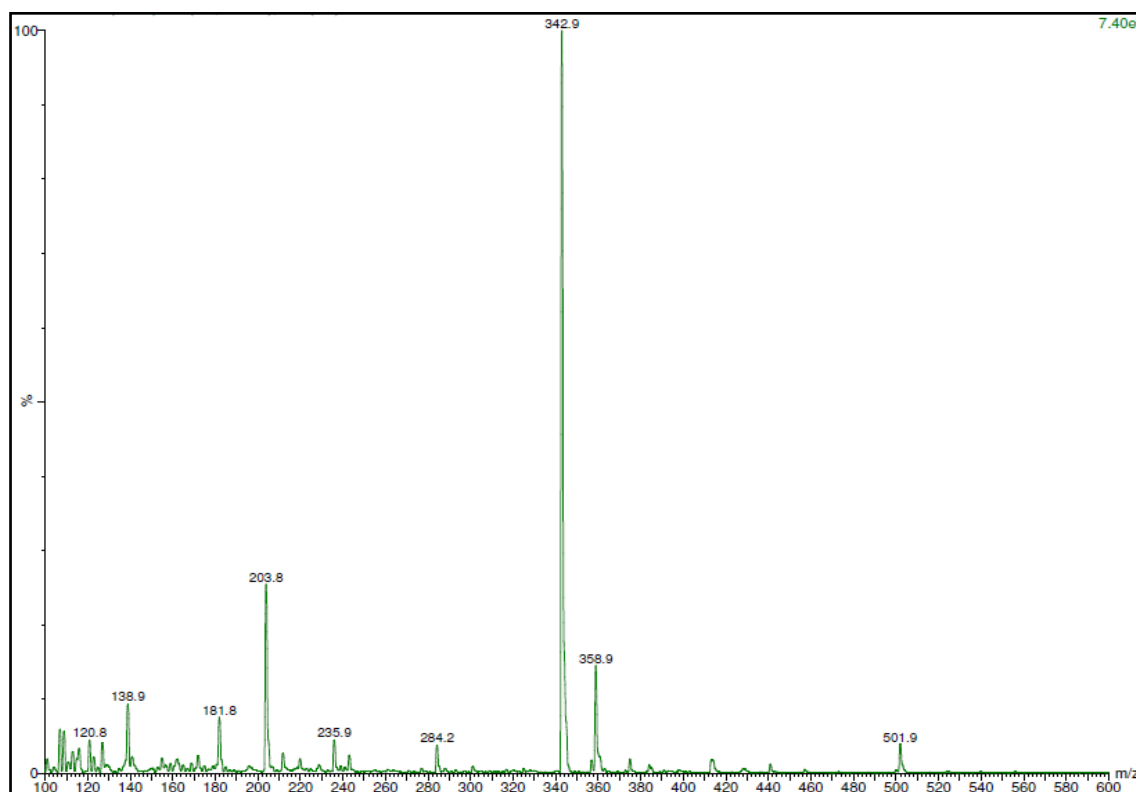
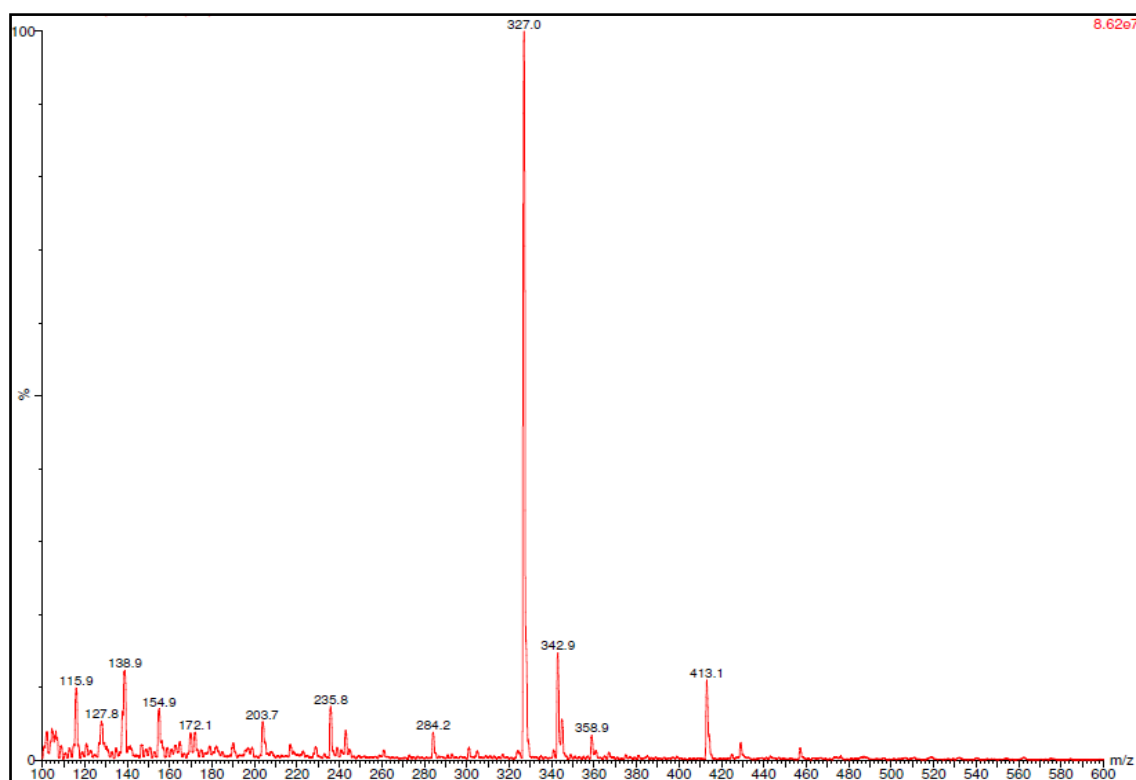
Figura 144– Espectro de massas (MeOH) do composto (**28**), obtido no modo positivoFigura 145– Espectro de massas (MeOH) do composto (**29**), obtido no modo positivoFigura 146– Espectro de massas (MeOH) do composto (**30**), obtido no modo positivo

Figura 147– Espectro de massas (MeOH) do composto (**31**), obtido no modo positivoFigura 147– Espectro de massas (MeOH) ESI-(+)- do composto (**32**)

APENDICE E – Dados Cristalográficos de HPzAm4E
Tabela E – Dados cristalográficos de HPzAm4E (2)

Composto		HPzAm4E (2)
Fórmula molecular		C ₈ H ₁₂ N ₆ S
Massa molecular, gmol ⁻¹		224,30
Temperatura, K		296,92
Sistema cristalino		Monoclínico
Grupo de espaço		P2 ₁ /n
Dimensões da célula unitária	a/Å	7,4889(3)
	b/Å	12,5626(5)
	c/Å	11,8649(4)
	α/°	90,00
	β/°	105,358(2)
	γ/°	90,00
Volume/Å ³		1076,39(7)
Z		4
ρ _{calc} /cm ³		1,384
μ/mm ⁻¹		0,278
		472,0
Tamanho do cristal/mm ³		0,330 × 0,330 × 0,252
Radiação		MoKα (λ = 0,71073)
2θ range for data collection/°		4,82 a 52,3 -9 ≤ h ≤ 9,
Index ranges		-15 ≤ k ≤ 15, -14 ≤ l ≤ 14
Reflexões coletadas		16447
Reflexões independentes		2144 [R _{int} = 0.0341, R _{sigma} = 0.0175]
Dados/restrições/parâmetros		2144/3/143
Goodness-of-fit on F ²		1.094
Final R indexes [I >= 2σ (I)]		R ₁ = 0,0365, wR ₂ = 0,0885
Final R indexes [all data]		R ₁ = 0,0478, wR ₂ = 0,0972
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³		0,24/-0,28

Cytotoxicity and Leishmanicidal Activity of Isoniazid-Derived Hydrazones and 2-Pyrazineformamide Thiosemicarbazones

Raquel S. Amin,^a Gisele S. S. Firmino,^a Ana C. P. D. Rego,^a Adriane L. Nery,^b
Sílvia A. G. Da-Silva,^b Marcus V. N. de Souza,^c Claudia Pessoa,^d Jackson A. L. C.
Resende,^e José D. Figueroa-Villar^f and Josane A. Lessa^{*a}

^aDepartamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 20550-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^bLaboratório de Imunofarmacologia Parasitária, Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 20551-030 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^cInstituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 21041-250 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^dLaboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará (UFC), 60430-270 Fortaleza-CE, Brazil

^eInstituto de Química, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24020-141 Niterói-RJ, Brazil

^fInstituto Militar de Engenharia (IME), 22290-270 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

The isoniazid-derived hydrazones 2-pyridinecarbaldehyde- (HPCIH), 2-acetylpyridine- (HAPIH), 2-benzoylpyridine- (HBPIH), 2-pyridineformamide- (HPAmIH) and 2-pyrazineformamide- (HPzAmIH) isonicotinoyl hydrazones, as well as the pyrazinamide-derived thiosemicarbazones 2-pyrazineformamide- (HPzAm4DH), *N*(4)-methyl-2-pyrazineformamide- (HPzAm4M), *N*(4)-ethyl-2-pyrazineformamide- (HPzAm4E) and *N*(4)-phenyl-2-pyrazineformamide- (HPzAm4Ph) thiosemicarbazones, were assayed for their action against intracellular amastigote form of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strains and the glioblastoma multiforme (SF-295), colon adenocarcinoma (HCT-116), ovarian cancer (OVCAR-8) and acute myeloid leukemia (HL-60) human tumor cell lines. All compounds exhibited leishmanicidal effects, with concentrations at which 50% of parasites were inhibited (IC₅₀) in the 10.70-18.84 μM range. Moreover, the compounds were up to 30-fold less toxic to macrophages than to the parasites. Pyrazinamide-derived thiosemicarbazones proved to have poor activity against the tumor cell lines at 5 μg mL⁻¹, whereas, in general the isoniazid-derived hydrazones presented good activity, being HAPIH and HBPIH the most potent compounds (IC₅₀ = 0.42-1.5 μM).

Keywords: antileishmanial activity, cytotoxicity, isoniazid, hydrazone, thiosemicarbazone

Introduction

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, with about 14 million new cases and 8.2 million cancer related deaths in 2012. Africa, Asia and Central and South America together correspond to 70% of the world's deaths.¹ Although chemotherapy has been an important form of cancer treatment, it presents some challenges such as need to improve the selectivity of drugs and

consequent reduction of undesirable side effects and the high incidence of cell resistance,² which demonstrate the urgency for the development of new anticancer agents.

Leishmaniasis are another set of diseases that require attention. They are caused by protozoa of the genus *Leishmania*, and present a spectrum of clinical forms, including cutaneous, mucosal and disseminated and diffuse cutaneous leishmaniasis.³ *Leishmania braziliensis* is one of the most important species that cause American tegumentary leishmaniasis and the major agent causing the

*e-mail: josane@uerj.br

mucosal forms in Brazil.⁴ Although regarded as neglected disease, leishmaniasis occurs in 98 countries, with an annual incidence of 1 to 1.5 million people worldwide.¹⁵ The treatment of leishmaniasis is restricted to a few drugs, quite costly and increasingly challenged by the development of parasite resistance.⁶ In this scenario, the search for drugs that are less toxic, more effective, and less costly is critical for the treatment of leishmaniasis in endemic countries.

Hydrazones and their thiosemicarbazone derivatives constitute a class of chelating agents which present antileishmanial⁷⁻⁹ and cytotoxic^{10,11} activities, among others.¹²⁻¹⁴ There are a few works on antileishmanial activity of hydrazones and their thiosemicarbazone derivatives, whereas their potential as anticancer agents has been extensively investigated. 3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (triapine), for example, is one promising candidate for anticancer drug, which is in clinical trial for the treatment of some kinds of cancer, such as pancreatic, cervical and ovarian.¹⁵ We recently demonstrated that 2-acetylpyridine thiosemicarbazones present cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas.¹⁶ It has been proposed that the mechanism of anticancer action of thiosemicarbazones involves inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase (RDR), a rate-limiting enzyme in DNA syntheses, which catalyzes the conversion of ribonucleotides into deoxyribonucleotides.¹⁴

In this work, the isoniazid (INH)-derived hydrazones 2-pyridinecarbaldehyde- (HPCIH, 1),

2-acetylpyridine- (HAPIH, 2), 2-benzoylpyridine- (HBPIH, 3), 2-pyridineformamide- (HPAmIH, 4) and 2-pyrazineformamide- (HPzAmIH, 5) isonicotinoyl hydrazones, as well as the pyrazinamide (PZA)-derived thiosemicarbazones 2-pyrazineformamide- (HPzAm4DH, 6), *N*(4)-methyl-2-pyrazineformamide- (HPzAm4M, 7), *N*(4)-ethyl-2-pyrazineformamide- (HPzAm4E, 8) and *N*(4)-phenyl-2-pyrazineformamide (HPzAm4Ph, 9) thiosemicarbazones (Figure 1), were assayed for their action against *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains and the glioblastoma multiforme (SF-295), colon adenocarcinoma (HCT-116), ovarian cancer (OVCAR-8) and acute myeloid leukemia (HL-60) human tumor cell lines. Cytotoxicity of 2 against SK-N-MC (human neuroepithelioma cell line) has been demonstrated by Bernhardt *et al.*,¹⁷ which stimulated us to study the biological action of this and other compounds.

INH and PZA (Figure 1), along with ethambutol and rifampin, are some of the most important drugs used in the treatment of tuberculosis.¹⁸ Mendez *et al.*¹⁹ revealed that PZA displays *in vitro* antileishmanial activity on both promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania major* with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 16.1 and 8.2 μM, respectively, after 48 h treatment. Moreover, PZA dramatically decreased lesion development and the parasite burden in C57BL/6 mice infected with the parasite.¹⁹ Thus, we have been interested in evaluating the effects of structural modification of PZA, as well as INH, by including a hydrazone or thiosemicarbazone scaffold on its antileishmanial action.

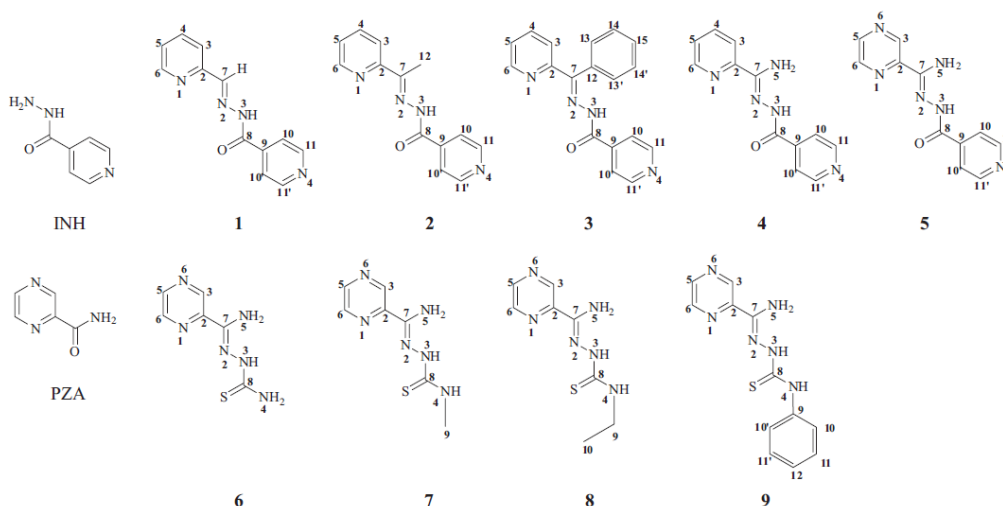


Figure 1. Structures of isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA) and their derivatives 1-9.

Experimental

Physical measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification. Melting points were determined on a Uni-Melt capillary melting point apparatus (Arthur Hoover Thomas Company). Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin Elmer Fourier transform infrared (FTIR) Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000-400 cm^{-1}). Electronic spectra were recorded on an Agilent Technologies 8453 spectrophotometer at room temperature, using spectrophotometric grade solvents (dimethylformamide (DMF) or dimethylsulfoxide (DMSO)). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on a Varian multinuclear UNITY-300 (600 MHz), for compounds **1-3** and **5-9**, or on a Bruker (400 MHz) spectrometer, for compound **4**, using DMSO- d_6 as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference. The ^1H resonances were assigned based on chemical shifts and multiplicities of ^1H NMR and 2D NMR correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH_x) was determined by using attached proton test (APT) experiments. Assignments of the protonated carbons were made by 2D heteronuclear single quantum coherence (HSQC). Information on the configurational arrangement of compound **4** was obtained by using nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) experiment. High resolution mass spectra of the novel compounds in methanol solution were obtained in the negative ion mode on a Bruker micrOTOF-Q II electrospray ionization-tandem quadrupole-time-of-flight (ESI-Qq-TOF) (for compounds **8** and **9**) or in the positive ion mode on a Bruker TOF Compact Electrospray (for compound **4**) instrument.

Synthesis of isoniazid and/or pyrazinamide-based molecules

Synthesis of HPCIH (**1**),²⁰ HAPIH (**2**)¹⁷ HBPIH (**3**),^{17,21} HPzAmIH (**5**)²² as well as HPzAm4DH (**6**)²³ and HPzAm4M (**7**)²³ are described in the literature. IR and NMR data were compatible with the proposed structures (Supplementary Information).

The novel compounds 2-pyridineformamideisonicotinoyl hydrazone (HPAmIH, **4**), *N*(4)-ethyl-2-pyrazineformamide-thiosemicarbazone (HPzAm4E, **8**) and *N*(4)-phenyl-2-pyrazineformamide-thiosemicarbazone (HPzAm4Ph, **9**) were prepared following the literature procedure for the reduction of 2-cyanopyridine and 2-cyanopyrazine.²⁴ Thus, sodium (0.0493 g, 2.1 mmol) was solubilized in 25 mL of dry methanol. 2-Cyanopyridine (1.249 g, 12.0 mmol, for

production of compound **4**) or 2-cyanopyrazine (1.261 g, 12.0 mmol, for production of compounds **8** and **9**) was then added, and the mixture was stirred for 0.5 h. After that, for the production of **4**, **8** and **9**, equimolar amount of isoniazid (1.645 g), *N*(4)-ethyl-3-thiosemicarbazide (1.430 g) or *N*(4)-phenyl-3-thiosemicarbazide (2.006 g), respectively, was added in small portions over a period of 0.5 h. The mixture was refluxed for 4 h and stirred for 24 h. The resulting solids were then filtered off, washed with methanol followed by diethyl ether, and dried *in vacuo*.

2-Pyridineformamideisonicotinoyl hydrazone (**4**)

White solid; yield: 40%; m.p.: > 240 °C; UV-Vis (DMSO) λ_{max} / nm 325; IR (KBr) ν_{max} / cm^{-1} 3392, 3180, 3133, 1546, 1621, 842, 804, 749; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (*E* isomer (90%)) 7.03 (s, 2H, N5H₂), 7.51 (m, 1H, H5), 7.82 (s, 2H, H10), 7.92 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, H4), 8.18 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H3), 8.62 (d, 1H, *J* 4.4 Hz, H6), 8.73 (d, 2H, *J* 5.6 Hz, H11), 10.41 (s, 1H, N3H); δ (*Z* isomer (10%)) 6.83 (s, 2H, N5H₂), 7.42 (m, 1H, H5), 7.71 (d, 2H, *J* 4.2 Hz, H10), 7.66-7.72 (m, 1H, H4), 7.77-7.85 (m, 1H, H3), 8.56 (d, 1H, *J* 4.7 Hz, H6), 8.75-8.70 (m, 1H, H11), 10.63 (s, 1H, N3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (*E* isomer (90%)) 120.83, 121.70, 124.98, 137.01, 141.54, 148.16, 149.32, 149.99, 150.37, 161.34; δ (*Z* isomer (10%)) 120.08, 123.18, 124.57, 136.96, 142.36, 143.69, 148.07, 149.41, 150.16, 167.19; ESI-TOF calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}$ [M]⁺: 242.1042; found: 242.1044.

N(4)-Ethyl-2-pyrazineformamide thiosemicarbazone (**8**)

Yellow solid; yield: 50%; m.p.: 180-183 °C; UV-Vis (DMF) λ_{max} / nm 354, 1.80×10^5 ; IR (KBr) ν_{max} / cm^{-1} 3439, 3342, 3327, 3149, 2964, 1655, 1537, 778, 566; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 1.14 (t, 3H, *J* 7.1 Hz, CH₃), 3.60 (m, 2H, CH₂), 6.94 (s, 2H, N5-H), 8.49 (t, 1H, *J* 6.0 Hz, N4-H), 8.59 (m, 1H, H5), 8.66 (d, 1H, *J* 2.7 Hz, H6), 9.70 (d, 1H, *J* 1.8 Hz, H3), 10.09 (s, 1H, N3-H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 14.83, 38.18, 140.25, 142.55, 143.63, 144.60, 145.80, 176.02; ESI-TOF calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_6\text{S}$ [M]⁺: 223.0766; found: 223.0991.

N(4)-Phenyl-2-pyrazineformamide thiosemicarbazone (**9**)

Yellow solid; yield: 85%; m.p.: 180-182 °C; UV-Vis (DMF) λ_{max} / nm 358, 1.68×10^5 ; IR (KBr) ν_{max} / cm^{-1} 3414, 3275, 3225, 3165, 3028, 2962, 1658, 1545, 744, 594; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.14 (s, 2H, N5-H), 7.19 (m, 1H, H12), 7.36 (m, 2H, H10), 7.58 (m, 2H, H11), 8.63 (m, 1H, H5), 8.69 (d, 1H, *J* 2.3 Hz, H6), 9.85 (d, 1H, *J* 1.4 Hz, H3), 10.01 (s, 1H, N4-H), 10.52 (s, 1H, N3-H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 125.07, 126.01, 127.90, 130.34, 141.11, 142.59, 143.96, 144.91, 145.54, 175.11;

ESI-TOF calcd. for $C_{12}H_{11}N_6S$ [M]⁺: 271.0766; found: 271.0984.

X-Ray diffraction analysis

Single crystals of $[H_2PCIH]NO_3 \cdot H_2O$ (**1a**) and HPzAm4E (**8**) were obtained by slow evaporation of **1** and **8** in an ethanolic solution, in the presence and absence of nitrate, respectively. Data were collected at room temperature on a Bruker D8 VENTURE equipped with Mo K α high-brilliance microfocus ($I\mu S$) radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) and a PHOTON 100 CMOS detector. The instrument was controlled with the APEX2 software package.²⁵ Data were processed using the integrated plug-in in the controlling software package (SAINT),²⁵ and corrected for absorption by the multiscan semi-empirical method implemented in SADABS.²⁵ Using Olex2,²⁶ the structure was solved with the SHELXS-97²⁷ structure solution program using direct methods and refined with the SHELXL-2013²⁷ refinement package using least squares minimization. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.

Leishmanicidal activity

Antileishmanial activity studies were performed against intracellular amastigote forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MCAN/BR/98/R619). For this, resident macrophages were obtained from peritoneal cells of Swiss Webster mice after a peritoneal injection of 5 mL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium. For adherence, the peritoneal cells (2×10^6 per mL) were plated onto glass coverslips placed within the wells of a 24-well culture plate (0.5 mL well^{-1}) and incubated at 37°C in $5\% \text{ CO}_2$ for 1 h. After removing the non-adherent cells, the monolayers of macrophages were infected with promastigotes of *L. braziliensis* (ratio of 5 promastigotes for each macrophage) for 4 h at 37°C and $5\% \text{ CO}_2$. The infected macrophages were washed and incubated with different concentrations of the tested compounds in RPMI medium supplemented with 10% of fetal bovine serum for 48 h at 37°C and $5\% \text{ CO}_2$. Each compound was previously dissolved in DMSO (stock solution). The final concentration of DMSO in the RPMI culture medium was kept below 0.3% (v/v). Controls were incubated with medium alone or with 0.3% of DMSO. The monolayers were then stained with Giemsa stain, and at least 100 infected macrophages per sample were counted under optical microscopy. After that, the infection index (% infected macrophages \times number of

amastigotes / total number of macrophages) was calculated. IC_{50} was determined by logarithmic regression analysis using GraphPad Prism 5. All assays were performed in at least three replicates and the results are shown as mean of three independent experiments.

To evaluate the toxicity of INH and PZA derivative molecules on mammalian cells, monolayers of murine macrophages (4×10^6 in $200 \mu\text{L}$) were incubated with the compounds ($1.5\text{--}400 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolved in RPMI medium supplemented with 10% of fetal bovine serum for 48 h at 37°C and $5\% \text{ CO}_2$. Controls were treated with medium or 1% of DMSO (the major final concentration of the diluent). Viability of macrophages was then assessed by measuring the mitochondrial dependent reduction of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to formazan. For this purpose, MTT ($10 \mu\text{L}$ at 10 mg mL^{-1}) was added and monolayers of macrophages were incubated at 37°C and $5\% \text{ CO}_2$ for 3 h. The medium was removed and formazan crystals were dissolved in $180 \mu\text{L}$ of DMSO. The absorbance was read at 570 nm using a microplate spectrophotometer. The 50% of cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined by logarithmic regression analysis using GraphPad Prism 5.

Tumor cell culture and cytotoxic activity

SF-295, HCT-116, OVCAR-8 and HL-60 cancer cell lines, from the National Cancer Institute, were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol L^{-1} glutamine, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin, and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin at 37°C and $5\% \text{ CO}_2$. Each compound was previously dissolved in DMSO (stock solution). The final concentration of DMSO in the RPMI culture medium was kept below 0.1% (v/v). PZA, INH and **1-9** ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) were incubated with SF-295, HCT-116 and OVCAR-8 cell lines, for 72 h. The cell viability was determined by reduction of MTT to formazan.²⁸

Compounds that inhibited the proliferation in more than 50% were selected for determination of IC_{50} against SF-295, HCT-116, OVCAR-8 and HL-60 tumor cell lines. To this end, $5\text{--}0.009 \mu\text{g mL}^{-1}$ range for compound concentration was used. All experiments were performed in at least three replicates per compound and results shown are the average of three independent experiments.

Results and Discussion

Characterization of **4**, **8** and **9**

Compound **4**, as well as **5**, melts at a temperature above 240°C . The similar hydrazones **1-3**, in turn, present

melting point lower than 200 °C. The higher melting point values for **4** and **5** are probably due to the presence of NH₂ group, which may be involved in intermolecular hydrogen bonds. Vibrations in the infrared spectrum of **4** attributed to $\nu_a(\text{NH}_2)$, $\nu_s(\text{NH}_2)$ and $\nu(\text{N-H})$ were observed at 3392-3133 cm⁻¹. Absorptions at 1659 and 1621 cm⁻¹ were attributed to $\nu(\text{C=O})$ and $\delta(\text{NH}_2)$, respectively. These absorptions are shifted in relation to those present in the infrared spectrum of INH. One absorption at 1546 cm⁻¹ attributed to $\nu(\text{C=N})$ was observed in the spectrum of **4**, but is absent in the IR spectrum of INH, suggesting that the condensation reaction took place, giving rise to an imine group in the molecular structure of **4**. The C-H out-of-plane bending ($\gamma\text{-CH}$) or ring bending ($\beta\text{-ring}$) absorptions from pyridine rings were present at 842, 804, 750 and 679 cm⁻¹.

Vibrations attributed to $\nu_a(\text{NH}_2)$, $\nu_s(\text{NH}_2)$ and $\nu(\text{N-H})$ were observed at 3275-3414 cm⁻¹ in the IR spectra of **8** and **9**. Absorptions at 1655, 1533 and 778 cm⁻¹ in the spectrum of **8** were attributed to $\delta(\text{NH}_2)$, $\nu(\text{C=N})$ and $\nu(\text{C=S})$, respectively. These bands were observed at 1658, 1545 and 748 cm⁻¹, respectively, in the spectrum of **9**. The in-plane deformation mode of the pyrazine ring was present at 566 and 594 cm⁻¹ in the spectra of **8** and **9**, respectively.

We observed duplicated signals in the ¹H and ¹³C NMR spectra of **4**, suggesting a mixture of two isomers, with the major one accounting for 90%. An analysis of the ¹H NMR spectrum of **4** shows that the maximum difference in δ between the signals of the isomers is observed for C3H proton of the *ortho*-pyridine group ($\Delta(\delta\text{H}(3)) = 0.4$ ppm). For other protons of both pyridine rings, the difference in chemical shifts between the two isomers is significantly smaller and in general does not exceed 0.1 ppm. For the amines N3H and N5H₂, we observed a difference in δ of 0.22 and 0.20 ppm, respectively. In order to obtain more information about the identity of the isomers, NOESY analysis was performed (Supplementary Information). For the major isomer, we observed spatial interaction between N5H₂ and H3, as well as between N3H and N5H₂. These interactions were not observed for the minor isomer. Thus, according to the analysis, the major isomer adopts the *E* configuration in solution, whereas the minor one corresponds to the *Z* configurational isomer. The proposed arrangements justify the most significant differences observed between chemical shifts of C3H and amine groups in both isomers. NMR spectra of similar hydrazones with the same behavior in solution had previously been observed and duplicated signals had been attributed to the presence of *E* and *Z* configurational isomers in solution^{22,29} (Figure S16).

Only one signal for each proton was observed in the ¹H NMR spectra of **8** and **9**. The N3H chemical shifts at 10.09 and 10.52 ppm for **8** and **9**, respectively, indicate

the molecules adopt the *E* configuration. Chemical shifts higher than 175 ppm observed for the signals of C8 in both compounds are typical of C=S, which suggest the thiosemicarbazones are in the thione form in solution.¹⁶

X-Ray diffraction analysis

X-Ray crystal data of compounds [H₂PCIH]NO₃·H₂O (**1a**) and HPzAm4E (**8**) are summarized in Table S1. Selected intra-molecular bond distances and angles for **1a** and **8**, as well as for HBPIH (**3**),²¹ HPzAm4DH·H₂O²³ and HPzAm4M·2H₂O²³ are given in Tables S2 and S3. Selected dihedral angles, hydrogen bond distances (Å) and angles (°) for **1a** and **8** are shown in Tables S4 and S5, respectively. The Oak Ridge thermal ellipsoid plot (ORTEP) representation of asymmetric unit, showing ellipsoids displayed at 50% probability level, is shown in Figure 2.

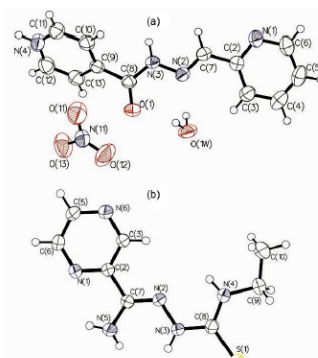


Figure 2. ORTEP representation of asymmetric unit of [H₂PCIH]NO₃·H₂O (**1a**) (a) and HPzAm4E (**8**) (b), with ellipsoids at the 50% probability level.

The crystalline form of **1a** is a nitrate salt monohydrate (Figure 2a). The molecule is protonated at *p*-pyridine ring of the isoniazid bulk, which is hydrogen bonded with a nitrate ion (Figures 2a and 3). The C7–N2 and C8–O1 bond lengths, 1.220(2) and 1.272(2) Å, respectively, are expected for formally double bonds, whereas N2–N3 and N3–C8 lengths of 1.375(2) and 1.345(2) Å agree with the single character of these bonds.²¹ Thus, **1a** is in the keto form, the same tautomer observed in crystal structure of its analog HBPIH (**3**).²¹ Both compounds present similar values of bond distances and bond angles. The dihedral angles C2–C7–N2–N3 and N2–N3–C8–O1 are 178.83(18) and –1.8(3)°, respectively, for **1a** and suggest the molecule is in the *EZ* conformation, in relation to the C2–C7 and N3–C8 bonds. HBPIH (**3**), in turn, adopts *ZZ* conformation, probably to minimize steric hindrance due to the benzoyl bulk.²¹

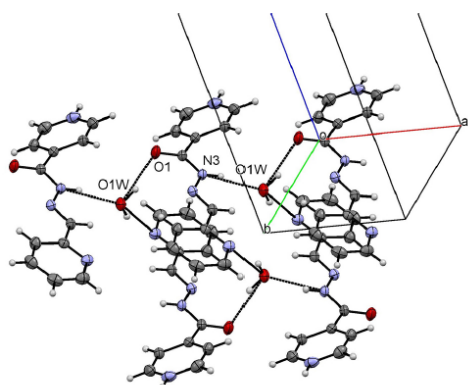


Figure 3. Hydrogen bond in $[H_2PCIH]NO_3 \cdot H_2O$ (1a) along a axis.

Bond distances and angles for HPzAm4E (**8**) are similar to those ones observed in the crystal structures of HPzAm4DH·H₂O²³ and HPzAm4M·2H₂O.²³ N3–C8 and C8–S1 bonds of 1.359(2) and 1.6765(17) Å, respectively, are in agreement with the thione form for **8**.¹⁶ According to values of N1–C2–C7–N2 and N2–N3–C8–S1 dihedral angles for **8**, the thiosemicarbazone adopts the *EE* conformation in relation to the C2–C7 and N3–C8 bonds (see Figure 2b). This conformation may occur, in part, as a result of the intramolecular N(4)–H(4)⋯N(2) hydrogen bond. Another relevant interaction, N(3)–H(3)⋯N(6)^{0.5-x, -0.5+y, 1.5-z}, forms the chain along b axis (Figure 4). In the supramolecular arrangement, the inverse dimers as result of the N(5)–4H(5B)⋯S1^{1-x, -y+1, -z+1} interaction are also observed.

Antileishmanial activity

To evaluate the antileishmanial effect of compounds we used intracellular amastigote of *L. braziliensis*, since this

parasite form is relevant for infected host treatment. All the compounds, including PZA and INH, reduced the infection index in relation to untreated control ($p < 0.05$), with IC₅₀ in the 33.36–10.70 μM range (Table 1). The isoniazid-derived hydrazones **1–5** were as potent as INH, while the thiosemicarbazone derivatives were in general more active than PZA. HPzAm4M (**7**) (IC₅₀ = 10.70 ± 2.84 μM), for example, was about 3-fold more active than the original molecule PZA (IC₅₀ = 33.36 ± 7.60 μM).

Microscopic observation of stained infected macrophages (Figure 5) illustrates the antiparasitic activity of tested compounds without apparent toxicity to host cell. The treatment with 25 μmol L⁻¹ of HPzAm4M (**7**) induces a major reduction in the number of amastigotes inside macrophages (Figure 5b) when compared to untreated control (Figure 5a). Under these experimental conditions, the antileishmanial effect of compounds was independent of nitric oxide production by infected macrophages (data not shown).

Meglumine antimonate (glucantime), a drug of choice for the treatment of leishmaniasis, was used as control. Its structure and composition is not completely understood and, in aqueous solution, it exists as a complex mixture in equilibrium.³⁰ Thus, the IC₅₀ value for glucantime was expressed as μg mL⁻¹ units. We found that all compounds are more potent against *L. braziliensis* than the antileishmanial drug.

Toxicity studies of the tested compounds on macrophage allow us to evaluate its selectivity index (SI). INH, PZA and their derivatives were selectively active against intracellular amastigote of *L. braziliensis*. The compounds with better SI values are HAPIH (**2**, SI = 30.00) and HPzAm4DH (**6**, SI = 20.83). These results suggest the studied hydrazones and thiosemicarbazones have potential application as antileishmanial agents.

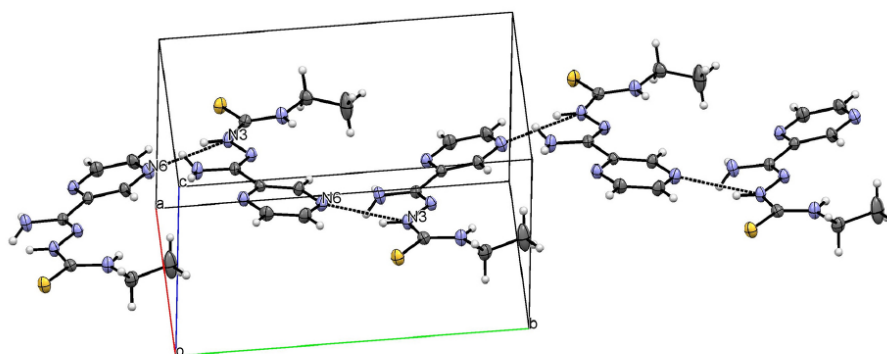


Figure 4. Hydrogen bond in HPzAm4E (**8**) along b axis.

Table 1. Data of toxicity of PZA and its derivatives 1-9 against *Leishmania braziliensis* (IC₅₀) and macrophages (CC₅₀) and the respective selectivity index

Compound	IC ₅₀ ± SD / (µg mL ⁻¹)	IC ₅₀ ± SD / µM	CC ₅₀ ± SD / µM	SI
INH	2.33 ± 0.60	17.04 ± 4.4	336.4 ± 21.74	19.74
HPCIH (1)	3.25 ± 0.79	14.41 ± 3.47	273.8 ± 136.47	19.00
HAPIH (2)	4.01 ± 0.49	16.71 ± 2.04	501.38 ± 124.80	30.00
HBPIH (3)	4.86 ± 2.55	16.10 ± 8.44	126.24 ± 59.46	7.84
HPAmIH (4)	3.54 ± 1.33	14.66 ± 5.53	108.63 ± 34.79	7.41
HPzAmIH (5)	5.02 ± 0.67	20.75 ± 2.76	127.98 ± 56.23	6.17
PZA	4.11 ± 0.94	33.36 ± 7.6	414.2 ± 48.21	12.4
HPzAm4DH (6)	3.66 ± 1.63	18.67 ± 8.28	389 ± 47.94	20.83
HPzAm4M (7)	2.25 ± 0.60	10.7 ± 2.84	153.18 ± 54.89	14.31
HPzAm4E (8)	4.63 ± 3.29	20.63 ± 14.69	235.8 ± 82.87	11.43
HPzAm4Ph (9)	5.13 ± 2.17	18.84 ± 7.99	76.64 ± 19.62	4.05
Glucantime	337 ± 94	–	> 10 (mg mL ⁻¹)	–

IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration; SD: standard deviation; CC₅₀: half maximal cytotoxic concentration; SI: selectivity index (CC₅₀ / IC₅₀); INH: isoniazid; PZA: pyrazinamide.

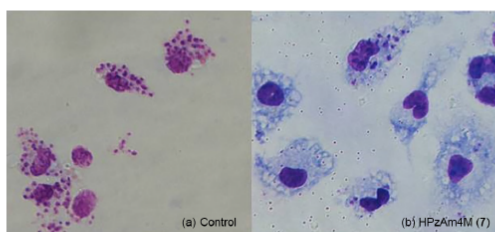


Figure 5. Aspect of infected macrophages: monolayers of murine macrophages were infected with promastigote form of *L. braziliensis* (ratio 5:1) during 4 h. After washing three times the infected monolayers were incubated with HPzAm4M (7) for 48 h. The monolayers were stained with Giemsa. The photographs show infected macrophages that (a) received no drug treatment (control) or (b) were treated with 25 µM of HPzAm4M (7).

Activity against human tumor cell lines

The cytotoxic effects of the studied compounds at the 5 µg mL⁻¹ concentration are listed in Table 2. In general, the thiosemicarbazones exhibit low cytotoxicity against all cell lines, except HPzAm4E (8), which presents moderate action against HCT-116 and OVCAR-8 cells. HAPIH (2) and HBPIH (3) are the most potent hydrazones, whose activity is superior to INH.

Compounds 2 and 3 were selected for further determining IC₅₀ of SF-295, HCT-116, OVCAR-8 and HL-60 cells (Table 3). The hydrazones present similar activity against all cell lines and are only approximately 1.6

Table 2. Growth inhibition (%) of human tumor cell lines by INH, PZA and their derivatives 1-9

Compound	Growth inhibition ^a / % (mean ± SD)		
	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
INH	14.47 ± 6.42	-3.79 ± 0.33	21.01 ± 2.85
HPCIH (1)	15.74 ± 3.82	15.47 ± 2.76	-6.31 ± 21.46
HAPIH (2)	49.79 ± 31.21	94.53 ± 3.46	72.20 ± 3.74
HBPIH (3)	78.69 ± 3.22	98.63 ± 3.18	34.98 ± 46.73
HPAmIH (4)	22.37 ± 8.91	27.10 ± 6.91	38.39 ± 0.72
HPzAmIH (5)	15.88 ± 0.27	6.91 ± 1.73	2.60 ± 0.79
PZA	ND ^b	ND ^b	ND ^b
HPzAm4DH (6)	37.05 ± 4.49	7.74 ± 3.87	17.67 ± 0.22
HPzAm4M (7)	11.19 ± 5.96	23.67 ± 10.09	24.44 ± 1.58
HPzAm4E (8)	44.72 ± 14.27	52.60 ± 8.43	-7.64 ± 42.77
HPzAm4Ph (9)	15.36 ± 6.77	19.47 ± 4.01	29.02 ± 1.15

^aCell lines: HCT-116 (colon adenocarcinoma), OVCAR-8 (ovarian cancer) and SF-295 (glioblastoma multiforme); ^bND: not determined. SD: standard deviation; INH: isoniazid; PZA: pyrazinamide.

Table 3. Cytotoxic activity (IC_{50} , in μM) of HAPIH (2) and HBPIH (3) against SF-295, OVCAR-8, HCT-116 and HL-60 tumor cell lines, in comparison with doxorubicin

Compound	IC_{50} / μM (confidence interval, 95%)			
	SF-295	OVCAR-8	HCT-116	HL-60
2	1.44 (1.13 to 1.83)	0.78 (0.72 to 0.88)	0.82 (0.66 to 1.01)	0.44 (0.04 to 0.49)
3	1.53 (1.24 to 1.90)	0.81 (0.69 to 0.96)	0.90 (0.73 to 1.11)	0.42 (0.37 to 0.48)
Doxorubicin	0.42 (0.35 to 0.46)	0.49 (0.31 to 0.56)	0.23 (0.16 to 0.31)	0.04 (0.02 to 0.04)

IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration; SF-295: glioblastoma multiforme; OVCAR-8: ovarian cancer; HCT-116: colon adenocarcinoma; HL-60: acute myeloid leukemia.

up to 10-fold less effective than the control (doxorubicin) in inhibiting the cell growth.

Conclusions

PZA, INH and their derivatives exhibit leishmanicidal effects on *Leishmania braziliensis*. All compounds were more potent than glucantime and selectively active against intracellular amastigote of *L. braziliensis* in relation to macrophages.

Pyrazinamide-derived thiosemicarbazones have proved to have poor activity against SF-295, OVCAR-8 and HCT-116 cell lines. On the other hand, the isoniazid-derived hydrazones showed activity against the tumor cell lines at the tested concentration. The hydrazones HBPIH (3) and HAPIH (2) are the most efficient cytotoxic compounds, whose activities against the three cancer cell lines were higher than isoniazid. These compounds have also proved to be only approximately 1.6 up to ten times less effective than the control (doxorubicin) to inhibit the SF-295, OVCAR-8, HCT-116 and HL-60 tumor cell lines growth. Thus, the studies indicate the structural modification of isoniazid was an interesting strategy to improve its cytotoxicity against the tested cell lines.

Supplementary Information

Supplementary information (spectra used for the identification of synthesized and novel compounds, as well as X-ray crystal data of $[H_2PCIH]NO_3 \cdot H_2O$ (1a) and HPzAm4E (8)) is available free of charge at <http://jbc.sbq.org.br> as PDF file.

CCDC 1046288 and 1046289 contain supplementary crystallographic data for 1a and 8, respectively. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). The authors express sincere thanks to the LDRX-UFF for the X-ray facilities and measurements.

References

- <http://www.who.int/cancer/en/> accessed in November 2015.
- Shapira, A.; Livney, Y. D.; Broxterman, H. J.; Assaraf, Y. G.; *Drug Resist. Updates* **2011**, *14*, 150.
- Rottini, M. M.; Amaral, A. C. F.; Ferreira, J. L. P.; Silva, J. R. A. S.; Taniwaki, N. N. T.; Souza, C. S. F.; D'Escoffier, L. N.; Souza, F. A.; Haridoim, D. J.; Costa, S. C. G.; Calabrese, K. S.; *Exp. Parasitol.* **2015**, *148*, 66.
- Alvar, J.; Velez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.; *PLoS One* **2012**, *7*, 35671.
- Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; *Int. J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, 525.
- Dumetz, M. F.; Roy, S.; Arevalo, A.; Ponte-Sucre, J.; Dujardin, J. C.; *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2014**, *12*, 937.
- Muhammad, M.; Ismail, N. H.; Ali, M.; Khan, K. M.; Khan, W.; Kashif, S. M.; Asraf, M.; *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 5282.
- Carvalho, S. A.; Kaiser, M.; Brun, R.; Da Silva, E. F.; Fraga, C. A. M.; *Molecules* **2014**, *19*, 20374.
- Britta, E. A.; Scariot, D. B.; Falzirolli, H.; Ueda-Nakamura, T.; Silva, C. C.; Dias Filho, B. P.; Borsali, R.; Nakamura, C. V.; Britta, M. C.; *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 236.
- Soares, M. A.; Lessa, J. A.; Mendes, I. C.; Da Silva, J. G.; Santos, R. G.; Salum, L. B.; Daghestani, H.; Andricopulo, A. D.; Day, B. W.; Vogt, A.; Pesquero, J. L.; Rocha, W. R.; Beraldo, H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3396.
- Markovića, V.; Janičijević, A.; Stanojković, T.; Kolundžija, B.; Sladić, D.; Vujčić, M.; Janović, B.; Joksović, L.; Djurdjević, P. T.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Joksovića, M. D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 228.

12. Maia, P. I. S.; Graminha, A.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Batista, A. A.; Back, D. F.; Lang, E. S.; Ellena, J.; Lemos, S. S.; Salistre-de-Araujo, H. S.; Deflon, V. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1177.
13. Santos, M. R. L.; Barreiro, E. J.; Braz-Filho, R.; Miranda, A. L. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 471.
14. Beraldo, H.; Gambino, D.; *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 159.
15. <http://www.clinicaltrials.gov/>, ClinicalTrials.gov identifiers: NCT00288093, NCT02595879, NCT02466971, accessed in November 2015.
16. Lessa, J. A.; Mendes, I. C.; Da Silva, P. R.; Soares, M. A.; Santos, R. G.; Speziali, N. C.; Romeiro, N. L.; Beraldo, E. J.; Barreiro, H.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5671.
17. Bernhardt, P. V.; Wilson, G. J.; Sharpe, P. C.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R.; *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 107.
18. Manjunatha, U. H.; Smith, P. W.; *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5087.
19. Mendez, S.; Traslavina, R.; Hinchman, M.; Huang, L.; Green, P.; Cynamon, M. H.; Welch, J. T.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 5114.
20. Armstrong, C. M.; Bernhardt, P.; Richardson, V. P.; Chin, D. R.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *6*, 1145.
21. Ababei, L. V.; Kriza, A.; Musuc, A. M.; Andronescu, C.; Rogozea, E. A.; *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, *101*, 987.
22. Glushkov, R. G.; Modnikova, G. A.; L'vov, A. I.; Krylova, L. Y.; Pushkina, T. V.; Solov'eva, T. A.; Gus'kova, N. P.; *Pharm. Chem. J.* **2004**, *38*, 16.
23. Castineiras, A.; Garcia-Santos, I.; Nogueiras, S.; Rodriguez-Gonzalez, I.; Rodriguez-Riobo, R.; *J. Mol. Struct.* **2014**, *1074*, 1.
24. West, D. X.; Swearingen, J. K.; Valdes-Martinez, J.; Hernandez-Ortega, S.; El-Sawaf, A. K.; Meurs, F. V.; Castineiras, A.; Garcia, I.; Bermejo, E.; *Polyhedron* **1999**, *18*, 2929.
25. Bruker AXS Inc.; *APEX2, SAINT, SADABS*; Bruker AXS Inc., Madison, 2014.
26. Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H.; *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339.
27. Sheldrick, G. M.; *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112.
28. Mosman, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
29. Kovarikova, P.; Vavrova, K.; Tomalova, K.; Schongut, M.; Hruskova, K.; Haskova, P.; Klimes, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 295.
30. Frézard, F.; Martins, P. S.; Barbosa, M. C. M.; Pimenta, A. M. C.; Ferreira, W. A.; Melo, J. E.; Mangrum, J. B.; Demicheli, C.; *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 656.

Submitted: July 30, 2015

Published online: November 25, 2015

RESEARCH ARTICLE

Synthesis, Antitubercular and Anticancer Activities of *p*-nitrophenylethylenediamine-Derived Schiff Bases

Raquel S. Amim¹, Cláudia Pessoa², Maria C. S. Lourenço³, Marcus V. N. de Souza⁴ and Josane A. Lessa^{1*}

¹Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro–UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ²Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará–UFC, Fortaleza, CE, Brazil; ³Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz –FioCruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ⁴Instituto de Tecnologia em Fármacos–Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz–FioCruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract: *Background:* Schiff bases have been greatly studied in biological field due to their wide range of pharmacological activities, such as antitubercular and antitumour. In the search of novel antitubercular agents, several compounds containing pharmacophoric group of ethambutol have been synthesized and evaluated against mycobacteria species causing tuberculosis. In this work, we investigate whether ethylenediamine, Schiff base as well as nitro group together could contribute to the formation of novel molecules with dual biological activities: antitubercular and anticancer.

Methods: A series of Schiff bases (3–12) derived from *p*-nitrophenylethylenediamine (1) as well as *N,N'*-bis(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (2) were synthesized and assayed for their action against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain and the human tumour cell lines SF-295 (glioblastoma multiforme), HCT-116 (colon adenocarcinoma) and OVCAR-8 (ovarian cancer).

Results: Among the compounds that showed antimycobacterial effects, 4 was more active than ethambutol, the antitubercular drug used as positive control. Also, compounds 1, 8, 10 and 12 were able to reduce strongly the viability of the tumour cell lines at 5 µg/mL⁻¹.

Conclusion: According to studies, some modifications on *p*-nitrophenylethylenediamine (1) were an effective strategy to obtain compounds with antiproliferative activities. Also, Schiff base 4 proved to be the lead antitubercular compound.

ARTICLE HISTORY

Received: April 26, 2016
Revised: October 09, 2016
Accepted: October 31, 2016

DOI:
10.2174/1573406412666161104123
149

Keywords: Schiff bases, anticancer agent, ethylenediamine, antitubercular activity, nitro compound.

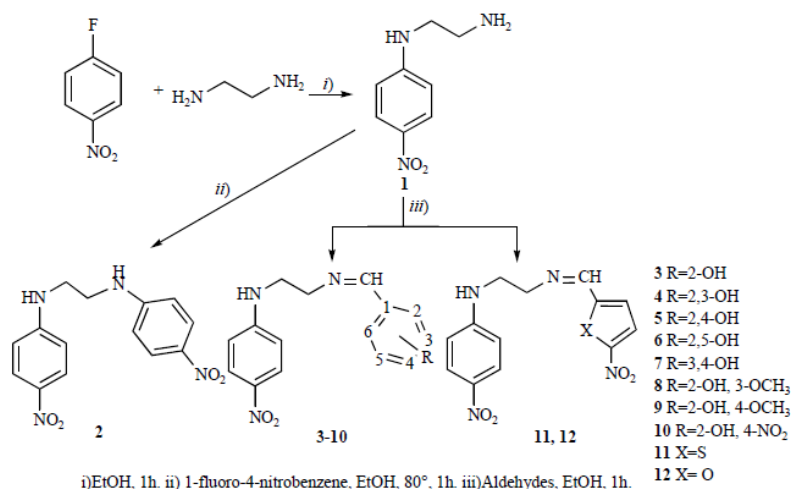
1. INTRODUCTION

Diamines constitute a versatile class of compounds with a wide range of applications in Medicinal Chemistry field. Considering that, 1,2-ethylenediamine, e.g., is a pharmacophore group of ethambutol (EMB), a front-line antitubercular drug, so that several compounds containing this group have been synthesized and evaluated against mycobacteria species causing tuberculosis (TB) [1–3]. Among these compounds, SQ109 deserves attention due to its activity to multidrug resistant strains (MDR-TB), which includes the EMB resistant ones. The mechanism of action of SQ109 seems to be different of this antitubercular drug [4]. TB killed 1.5 million people only in 2014 and around 1 billion people are infected with the disease every year [1, 5]. It has become more prevalent due to a variety of factors such as

AIDS, lowered immunity and widespread drug resistance [6]. In addition, the standard treatment for adult respiratory TB has a long-term duration and is connected with several adverse effects like hepatotoxicity, skin reactions, gastrointestinal and neurological disorders [7–9]. Due to this life-threatening situation, an intense effort has been addressed to the development of new drugs and strategies that could effectively shorten the duration of chemotherapy and combat the emergence of resistant strains [10]. In the search for new drugs against TB and cancer, several classes of compounds containing the group nitro have been synthesized and evaluated [11]. In this context, it can be mentioned PA-824, a nitro imidazole derivative compound, which is in phase II trial against TB [12]. In the cancer field, nitro compounds have been recently studied as radio sensitizers in antitumour therapy, due to the bioreduction capacity of the nitro group, which releases intermediates in the redox process [13–15].

Cancer is responsible for at least 13% of deaths worldwide. Current statistics indicate that 1 in every 3 people will

*Address correspondence to this author at the Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro–UERJ, CEP 20550-900, Rio de Janeiro, Brazil; Tel/Fax: +5521-23340563, +55-21-23340104; E-mail: josane@uerj.br



Scheme 1. Scheme for the synthesis of *N*¹-(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (1) and its derivatives 2–12.

develop some form of cancer during their lifetime [16]. Surgery and radiotherapy dominated cancer treatment during the first half of the 20th century, whereas chemotherapy was first considered as a viable alternative in the 1940s. Nonetheless, despite the success of chemotherapy for cancer treatment, it faces some challenges such as, the search for novel approaches to improve drug selectivity and reduce undesirable side effects and high incidence of cell resistance [17–19].

In this sense, Schiff bases have received special attention in biological field due to their simple methods of preparation and versatility [20]. Many Schiff bases have been reported to display diverse pharmacological activities such as antifungal, antitubercular, anti-inflammatory, anti-viral, antimalarial, antitumour, anti-bacterial, anti-proliferative, anti-convulsant, antidepressant and angiotension-II receptor antagonists [15, 20–22]. Among different types of pharmacologically active Schiff bases, their anticancer activity alone or as metal complexes is one of the hottest topics of research worldwide [23].

In this work, *N*¹-(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (1), *N*¹, *N*²-bis(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (2) and the Schiff bases derivatives 3–12 were synthesized and assayed for their action against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain and the human tumour cell lines SF-295 (glioblastoma multiforme), HCT-116 (colon adenocarcinoma) and OVCAR-8 (ovarian cancer). Our interest consists in investigating whether the nitro, ethylenediamine and imine groups together could contribute to the formation of novel molecules with dual, antituberculosis and anticancer, biological activities.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Chemistry

The general synthetic scheme of the target compounds is described in Scheme 1. *p*-Nitrophenylethylenediamine (1) was first prepared from the reaction of 1-fluoro-4-

nitrobenzene and 1,2-ethylenediamine and used as precursor for the formation of 2–12. Syntheses of 1 [24] and 2 [25] are described in the literature, then spectroscopic data confirm the formation and purity of these compounds. The aldehydes employed for the Schiff bases synthesis were selected based on our previous studies of its anticancer and antitubercular activities [26, 27]. The novel Schiff bases 3–12 were obtained as yellow solid at room temperature in 55–88% yields.

2.2. Characterization

Only one band attributed to NH stretching of secondary amine is present at 3289–3416 cm⁻¹ in the IR spectra of 3–12. Besides, absorptions attributed to C=N stretching at 1632–1648 cm⁻¹ are present in the IR spectra of 3–12, but absent in the IR spectrum of 1, which confirms that the reaction of condensation has taken place, giving rise to Schiff bases.

The most thermodynamically favourable isomer, *E*, is the predominant form observed in the ¹H NMR spectra of 3–12 [19,28]. The signals attributed to hydrogen and carbon of the imine group occur at 8.34–8.98 ppm and 156.19–176.19 ppm, respectively in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the Schiff bases. For all the compounds, it was possible to observe a majority peak attributed to the molecular ion in its mass spectra.

2.3. Antimycobacterial Activity

According to the results (Table 1), the precursor (1) does not exhibit antimycobacterial activity at the tested concentrations. The biological action is observed for 4, 5 and 7, in which the presence and the positions of hydroxyl substituents seem to be important for the bioactivity.

Compound 4 showed higher inhibitory activity than ethambutol, the antitubercular drug used as positive control. It was not possible to correlate antitubercular activity with par-

Table 1. *In vitro* activity of 1-12 against *M. tuberculosis* H37Rv strain and its calculated logP values.

Compound	MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LogP ^b
1	> 18.12	1.44 ± 0.71
2	> 30.23	1.66 ± 0.63
3	> 28.53	3.06 ± 0.81
4	7.53	0.79 ± 0.92
5	30.13	-0.99 ± 0.41
6	> 30.13	0.00 ± 0.73
7	30.13	-0.62 ± 0.36
8	> 31.53	-0.71 ± 0.23
9	> 31.53	-0.95 ± 0.30
10	ND ^c	ND ^c
11	ND ^c	ND ^c
12	ND ^c	ND ^c
Ethambutol	15.3	

^aAntimycobacterial activity expressed as Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

^bLogP = logarithm to the base 10 of the partition coefficient (P), calculated using ALOGPS online program [29,30].

^cND not determined due to solubility limitations.

Table 2. Growth inhibition (%) of human tumour cell lines^a by 1–12.

Compound	Growth Inhibition (%)		
	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
1	95.65±1.70	96.63±0.91	88.62±2.23
2	6.65±10.48	-2.75±1.02	35.13±10.56
3	-4.65±4.98	-1.87±0.45	43.65±1.81
4	8.68±15.98	6.41±1.02	36.94±14.60
5	14.52±16.90	24.48±5.45	30.35±6.60
6	7.76±8.12	-0.90±1.36	51.12±4.78
7	37.86±8.78	48.83±7.61	38.40±2.31
8	96.30±0.79	94.54±0.45	73.28±1.32
9	18.04±3.01	7.21±2.39	49.19±1.07
10	92.78±4.19	68.91±33.97	55.61±2.06
11	2.20±3.67	0.46±3.07	40.85±1.98
12	96.20±3.01	74.21±8.98	60.92±3.30

^a Cell lines: HCT-116 (colon adenocarcinoma), OVCAR-8 (ovarian cancer) and SF-295 (glioblastoma multiforme)

tion coefficient, a physicochemical property widely used as parameter for structure-activity relationship studies.

2.4. Cytotoxic Activity

Cytotoxic action of 1–12 against the human tumour cell lines OVCAR-8 (ovarian cancer), HCT-116 (colon adenocarcinoma) and SF-295 (glioblastoma multiforme) was per-

formed according to Mosmans's MTT assay [31] and the results are shown as percentage of cell viability (Table 2).

Compounds 1, 8, 10 and 12 were able to reduce in more than 50% the viability of the three tumour cell lines at the tested concentration. One substitution on the primary amine in compound 1 by another *p*-nitrophenyl group, in compound 2, results in its inactivation. For compounds 5–7, differences

at the positions *ortho*, *meta* or *para* of the substituents on phenyl bulk do not promote significant changes in their activities. On the other hand, we observe that **8** is a potent cytotoxic compound, whereas its isomer *meta* (compound **9**) is not active.

Differences in biological behavior were also observed when the heteroatom is changed: compound **11**, which contains an *o*-nitro-thiophene as substituent, is inactive against HCT-116 and OVCAR-8 cells and presents moderate activity against SF-295 cells, whereas the equivalent compound **12**, in which there is a furan group instead of a thiophene one, is highly potent to all cell lines.

3. CONCLUSION

Some modifications on *p*-nitrophenylethylenediamine (**1**) were an effective strategy to obtain compounds with antitubercular and antiproliferative activities. Among the tested compounds, **1**, **8**, **10** and **12** showed the most significant activities against the tumour cell lines. Regarding antimycobacterial action studies, Schiff base **4** was more potent than ethambutol, suggesting that it is a promising compound. Further studies of selected compounds as ligands for the synthesis of metal complexes, such as iron, copper and zinc ones, should be carried on in order to evaluate the effect of coordination on its bioactivities.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Chemistry

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Infrared (IR) spectra were recorded on Thermo Scientific Nicolet FT-R 6700 series infrared spectrophotometer using KBr plates (4000–400 cm^{-1}). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on a Bruker (400 MHz) spectrometer, using DMSO- d_6 as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal reference. Low resolution mass spectra (MS) were obtained by electron-spray ionisation in a MicroMass ZQ 4000, using methanol as solvent.

4.2. General Procedure for the Synthesis of amine N^1 -(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine

A solution of 1-fluoro-4-nitrobenzene (0.2 ml, 1.5 mmol) in ethanol (10 ml) was added dropwise to ethane-1,2-diamine (0.1 ml, 1.5 mmol). The mixture was stirred for 1 h. The yellow solid obtained was filtered, washed with ethanol and dried under reduced pressure for 1 day.

4.2.1. N^1 -(4-Nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (**1**)

Yield: 80%; IR (KBr): $\nu = 3360, 3170, 1507, 1285 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 2.79$ (t, $J = 6.36 \text{ Hz}$, 2H, H1), 3.23 (t, $J = 6.11 \text{ Hz}$, 2H, H2), 3.97 (m, 2H, N1H), 6.66 (d, $J = 9.54$, 2H, H4), 7.33 (t, $J = 4.89$, 1H, N2H), 7.99 (m, 2H, H5) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 40.48, 45.85, 110.55, 126.16, 135.32, 154.67 \text{ ppm}$; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2]^+$: 181.2, found: 181.8.

4.3. General Procedure for the Synthesis of amine N^1, N^2 -bis(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine.

1-Fluoro-4-nitrobenzene (0.03 ml, 0.6 mmol) in ethanol (10 ml) was added dropwise to N^1 -(4-nitrophenyl)ethane-1,2-

diamine (109 mg, 0.6 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 80°C . The yellow solid obtained was filtered, washed with ethanol and dried under reduced pressure for 1 day.

4.3.1. N^1, N^2 -bis(4-Nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (**2**)

Yield: 66%; IR (KBr): $\nu = 3373, 3176, 1591, 1538, 1281 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 2.98$ (t, $J = 6.24 \text{ Hz}$, 2H, H1), 3.40 (m, 2H, H2), 6.70 (m, 4H, H4), 7.37 (m, 2H, N1H and N2H), 8.00 (m, 4H, H5) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 40.13, 41.31, 110.97, 126.23, 135.82, 154.39 \text{ ppm}$; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}]^+$: 325.3, found: 324.9.

4.4. General Procedure for the Synthesis of imines 3-12:

Solution of the aldehyde appropriate (0.6 mmol) in ethanol (10 ml) was added to N^1 -(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (109 mg, 0.6 mmol). The mixture was stirred for 1 h. After that, the solid obtained was filtered, washed with ethanol and dried under reduced pressure for 1 day.

4.4.1. 2-[(2-[(4-Nitrophenyl)amino]ethyl)imino]methyl]phenol (**3**)

Yield: 58%; IR (KBr): $\nu = 3336, 2947, 1629, 1541, 1274 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 3.53$ (q, $J = 5.87 \text{ Hz}$, 2H, H2), 3.79 (t, $J = 5.62 \text{ Hz}$, 2H, H1), 6.71 (d, $J = 9.29 \text{ Hz}$, 2H, H4), 6.88 (m, 2H, H10, H12), 7.32 (m, 1H, H11), 7.42 (m, 2H, H11, H13), 7.98 (m, 2H, H5), 8.54 (s, 1H, H7) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 43.02, 57.25, 110.92, 116.44, 118.53, 118.66, 126.21, 131.69, 132.36, 135.76, 154.48, 160.51, 167.12 \text{ ppm}$; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3]^+$: 284.3, found: 284.0.

4.4.2. 3-[(2-[(4-Nitrophenyl)amino]ethyl)imino]methyl]benzene-1,2-diol (**4**)

Yield: 85%; IR (KBr): $\nu = 3416, 1644, 1522, 1266 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 3.51$ (q, $J = 5.54 \text{ Hz}$, 2H, H2), 3.80 (t, $J = 5.62 \text{ Hz}$, 2H, H1), 6.64 (t, $J = 7.83 \text{ Hz}$, 1H, H12), 6.69 (s, 2H, OH), 6.71 (d, $J = 9.29 \text{ Hz}$, 2H, H4), 6.83 (m, 1H, H13), 7.45 (m, 2H, H11), 7.99 (d, $J = 9.29 \text{ Hz}$, 2H, H5), 8.48 (s, 1H, H7), 8.88 (m, H, N2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 43.06, 56.24, 110.85, 117.53, 117.61, 118.09, 121.86, 126.21, 135.80, 145.89, 151.26, 154.45, 167.29 \text{ ppm}$; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4]^+$: 300.3, found: 300.1.

4.4.3. 4-[(2-[(4-Nitrophenyl)amino]ethyl)imino]methyl]benzene-1,3-diol (**5**)

Yield: 59%; IR (KBr): $\nu = 3338, 1648, 1498, 1207 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 3.47$ (q, $J = 5.79 \text{ Hz}$, 2H, H2), 3.70 (t, $J = 5.75 \text{ Hz}$, 2H, H1), 6.71 (d, $J = 9.29 \text{ Hz}$, 2H, H4), 6.27 (t, $J = 8.56 \text{ Hz}$, 1H, H12), 7.17 (d, $J = 8.31 \text{ Hz}$, 1H, H13), 7.43 (t, $J = 5.50 \text{ Hz}$, H10), 7.99 (d, $J = 9.29 \text{ Hz}$, 2H, H5), 8.34 (s, 1H, H7), 9.93 (m, 3H, N2H, OH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): $\delta = 43.09, 55.92, 102.40, 106.78, 108.51, 111.17, 110.85, 115.11, 126.11, 133.30, 132.61, 135.63, 154.37, 161.64, 164.22, 163.12, 165.96 \text{ ppm}$; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}]^+$: 324.3, found: 323.9.

4.4.4. 2-[(2-[(4-Nitrophenyl)amino]ethyl)imino]methyl]benzene-1,4-diol (6):

Yield: 63%; IR (KBr): $\nu = 3289, 1647, 1503, 1246 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.50$ (q, $J = 5.87$ Hz, 2H, H2), 3.77 (t, $J = 5.62$ Hz, 2H, H1), 6.71 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H4), 6.79 (t, $J = 3.18$ Hz, 1H, H11), 6.98 (m, 1H, H13), 7.43 (m, 1H, H10), 7.98 (m, 2H, H5), 8.98 (s, 1H, H7), 8.88 (m, 3H, N2H, OH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 57.48, 110.85, 112.66, 116.49, 116.84, 118.25, 118.60, 119.89, 126.22, 124.52, 135.74, 149.28, 152.95, 154.49, 153.95, 166.86$ ppm; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}]^+$: 324.3, found: 323.9.

4.4.5. 4-[(2-[(4-Nitrophenyl)amino]ethyl)imino]methyl]benzene-1,2-diol (7):

Yield: 55%; IR (KBr): $\nu = 3340, 1645, 1498, 1266 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.47$ (q, $J = 5.79$ Hz, 2H, H2), 3.70 (t, $J = 5.75$ Hz, 2H, H1), 6.71 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H4), 6.27 (t, $J = 8.56$ Hz, 1H, H12), 7.17 (d, $J = 8.31$ Hz, 1H, H13), 7.43 (t, $J = 5.50$ Hz, 1H, H9), 7.99 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H5), 8.34 (s, 1H, H7), 9.93 (m, 3H, N2H, OH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 43.35, 55.91, 110.81, 113.73, 115.20, 119.5, 121.15, 126.09, 130.2, 135.46, 145.47, 154.50, 161.8$ ppm; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4]^+$: 300.3, found: 300.2.

4.4.6. 2-Methoxy-6-[(2-[(4-Nitrophenyl)amino]ethyl)imino]phenol (8)

Yield: 75%; IR (KBr): $\nu = 3358, 1632, 1503, 1242 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.53$ (s, 2H, H2), 3.77 (m, 5H, H1 e OCH₃), 6.71 (d, $J = 9.54$ Hz, 2H, H4), 6.79 (m, 1H, H12), 6.98 (m, 1H, H11), 7.44 (m, 2H, H13), 7.99 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H5), 8.51 (s, 1H, H7) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 42.89, 55.66, 56.68, 110.85, 114.71, 117.60, 118.25, 123.10, 126.11, 135.65, 147.91, 151.42, 154.35, 167.14$ ppm; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}]^+$: 337.3, found: 337.9.

4.4.7. 5-Methoxy-2-[(2-[(4-nitrophenyl)amino]ethyl)methyl]phenol (9):

Yield: 88%; IR (KBr): $\nu = 3348, 1640, 1513, 1250 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.49$ (q, $J = 7.09$, 2H, H2), 3.74 (m, 5H, H1, OCH₃), 6.32 (d, $J = 2.45$ Hz, 1H, H10), 6.38 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H, H13), 6.71 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H4), 7.26 (d, $J = 8.56$ Hz, 2H, H12), 7.99 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H5), 8.38 (s, 1H, H7) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 42.98, 55.14, 55.50, 100.87, 105.70, 110.79, 111.92, 126.10, 133.12, 135.66, 154.36, 163.18, 165.25, 165.82$ ppm; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}]^+$: 337.3, found: 337.9.

4.4.8. 4-Nitro-2-[(2-[(4-nitrophenyl)amino]ethyl)imino]methyl]phenol (10):

Yield: 83%; IR (KBr): $\nu = 3323, 1644, 1503, 1240 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.57$ (q, $J = 5.87$ Hz, 2H, H2), 3.82 (t, $J = 5.75$ Hz, 2H, H1), 6.66 (d, $J = 9.54$ Hz, 1H, OH), 6.74 (d, $J = 9.29$ Hz, 2H, H4), 8.05 (dd, $J = 9.66/3.06$ Hz, 1H, H10), 7.48 (t, $J = 5.87$ Hz, 1H, H13), 8.00 (d, $J = 9.05$ Hz, 2H, H5), 8.40 (d, 1H, H12), 8.69 (s, 1H, H7), 8.88 (m, 3H, N2H, OH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 41.97, 51.78, 111.04, 114.08, 122.12, 126.08, 129.03, 132.02, 134.25, 136.02, 154.12, 167.54, 176.19$ ppm;

ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}]^+$: 352.3, found: 352.9.

4.4.9. N-(4-Nitrophenyl)-N-[(5-nitro-2-thienyl)methylene]ethane-1,2-diamine (11):

Yield: 58%; IR(KBr): $\nu = 3389, 1647, 1503, 1246 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.51$ (q, $J = 5.87$ Hz, 2H, H2), 3.81 (t, $J = 5.50$ Hz, 2H, H1), 6.71 (m, 2H, H4), 7.37 (t, $J = 5.87$ Hz, 1H, N2H), 7.55 (d, $J = 4.40$, 1H, H11), 7.98 (m, 2H, H7), 8.11 (d, 1H, H10), 8.52 (s, 1H, H7) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 42.73, 58.95, 110.92, 126.16, 130.19, 130.36, 135.72, 148.35, 151.90, 154.49, 156.19$ ppm; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{SNa}]^+$: 343.3, found: 342.9.

4.4.10. N-[(5-Nitro-2-furyl)methylene]-N-(4-nitrophenyl)ethane-1,2-diamine (12):

Yield: 63%; IR (KBr): $\nu = 3355, 1644, 1515, 1277 \text{ cm}^{-1}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 3.53$ (q, $J = 5.80$ Hz, 2H, H2), 3.83 (t, $J = 5.60$ Hz, 2H, H1), 6.71 (m, 2H, H4), 7.26 (t, $J = 5.80$ Hz, 1H, N2H), 7.39 (d, $J = 5.70$ Hz, 1H, H11), 7.77 (m, 2H, H5), 7.99 (d, $J = 5.80$ Hz, 1H, H10), 8.31 (s, 1H, H7) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, (D_6) DMSO): $\delta = 42.73, 58.95, 110.92, 126.16, 130.19, 130.36, 135.72, 148.35, 151.90, 154.49, 156.19$ ppm; ESI-MS: m/z calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}]^+$: 327.3, found: 327.0.

4.5. Antitubercular Activity Assay

Anti-mycobacterial activities of compounds 1–12 were assessed against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 using the micro plate Alamar Blue assay (MABA) [32]. This methodology is nontoxic, uses a thermally-stable reagent and shows good correlation with proportional and BACTEC radiometric methods [33,34]. The method is described as follows: 200 ml of sterile deionized water was added to all outer-perimeter wells of 96 sterile well plates (falcon, 3072: Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) to minimize evaporation of the medium in the test wells during incubation. The 96 plates received 100 mL of the Middlebrook 7H9 broth (Difco laboratories, Detroit, MI, USA) and successive dilution of the compounds was performed directly on the plate. The final drug concentrations tested were 0.01–20.0 mgmL⁻¹. Plates were covered and sealed with parafilm and incubated at 37 °C for five days. A freshly prepared 1:1 mixture (25 mL) of Alamar Blue (Accumed International, Westlake/Ohio) reagent and 10% tween 80 was then added to the plate and incubated for 24 h. A blue color in the well was interpreted as no bacterial growth, and a pink color was scored as growth. The minimal inhibition concentration (MIC) was defined as the lowest drug concentration which prevented a color change from blue to pink. Ethambutol (EMB) was used as positive control in the tests.

4.6. Cytotoxic Activity Assay

All cancer cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 µg/mL penicillin, and 100 µgmL⁻¹ streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. Each compound was previously dissolved in DMSO (stock solution). The final concentration of DMSO in the RPMI culture medium was kept below 0.1% (v/v). Compounds 1–12 (5 µgmL⁻¹) were incu-

bated with the SF-295 (glioblastoma multiforme), HCT-116 (colon adenocarcinoma) and OVCAR-8 (ovarian cancer) human tumour cell lines, from National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA), for 72 h. The cell viability was determined by reduction in the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product as described by Mosmann [31]. All experiments were performed in at least three replicates per compound and results shown are the average of three independent experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for grants from CNPq and FAPERJ.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that article content has no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material comprises FTIR, NMR and mass spectra of 1–12 and is available on the publishers Web site along with the published article.

REFERENCES

- Vergara, F.M.F.; Henriques, M.G.M.O.; Candea, A.L.P.; Wardell, J.L.; De Souza, M.V.N. Antitubercular activity of α -diaminoalkanes, $H_2N(CH_2)_nNH_2$. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 4937-4938.
- Onajole, O.K.; Coovadia, Y.; Kruger, H.G.; Maguire, G.E.M.; Pillay, M.; Govender, T. Novel polycyclic 'cage'-1,2-diamines as potential anti-tuberculosis agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *54*, 1-9.
- Silva, S.A.; Leite, C.Q.F.; Pavan, F.R.; Masciocchi, N.; Cuin, A. Coordinative versatility of a Schiff base containing thiophene: Synthesis, characterization and biological activity of zinc(II) and silver(I) complexes. *Polyhedron*, **2014**, *79*, 170-177.
- Li, W.; Upadhyay, A.; Fontes, F.L.; North, E.J.; Wang, Y.; Crans, D.C.; Grzegorzewicz, A.E.; Jones, V.; Franzblau, S.G.; Lee, R.E.; Crick, D.C.; Jackson, M. Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, *58*, 6413-6423.
- Global tuberculosis report 2015. <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/> (Accessed in March 19, 2016).
- Narender, M.; Jaswanth, S.B.; Umasankar, K.; Malathi, J.; Raghuram, R.A.; Umaderi, K.R.; Dusthacker, A.V.N.; Venkat, R.K.; Raghuram, R.A. Synthesis, *in vitro* antimycobacterial evaluation and docking studies of some new 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3H)-one Schiff bases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 836-840.
- Tostmann, A.; Boeree, M. J.; Aamoutse, R. E.; de Lange, W. C.; van der Ven, A. J.; Dekhuijzen, R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2008**, *23*, 192-202.
- Frieden, T. R.; Sterling, T. R.; Munsiff, S. S.; Watt, C. J.; Dye, C. Tuberculosis. *The Lancet*, **2003**, *362*, 887-899.
- Paraskevopoulos, G.; Krátký, M.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Pávek, P.; Besra, G.; Viňšová, J. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 7292-7301.
- Primi, M.C.; Segretti, N.D.; Ferreira, E.I. Medicinal chemistry of new compounds to treat tuberculosis. *Curr. Clin. Pharmacol.*, **2015**, *10*, 139-159.
- Kandemirli, F.; Shvets, N.; Unsalan, S.; Kucukguzel, I.; Rollas, S.; Kovalishyn, V.; Dimoglo, A. The structure-antituberculosis activity relationships study in a series of 5-(4-aminophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione derivatives. A combined electronic-topological and neural networks approach. *Med. Chem.*, **2006**, *2*, 415-422.
- Tasneen, R.; Williams, K.; Amoabeng, O.; Minkowski, A.; Mdtuli, K.E.; Upton, A.M.; Nuemberger, E.L. Contribution of the nitroimidazoles PA-824 and TBA-354 to the activity of novel regimens in murine models of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2015**, *59*, 129-135.
- Langenbacher, M.; Abdel-Jalil, R.J.; Voelter, W.; Weinmann, M.; Huber, S.M. *In vitro* hypoxic cytotoxicity and hypoxic radiosensitization. Efficacy of the novel 2-nitroimidazole *N,N,N*-tris[2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl]amine. *Strahlenther. Onkol.*, **2013**, *189*, 246-254.
- Sharma, R. Nitroimidazole radiopharmaceuticals in hypoxia: part II cytotoxicity and radiosensitization applications. *Curr. Radiopharm.*, **2011**, *4*, 379-393.
- Montenegro, R.C.; Lotufo, L.V.; De Moraes, M.O.; Pessoa, C.O.; Rodrigues, F.A.R.; Bispo, M.L.F.; Cardoso, L.N.F.; Kaiser, C.R.; De Souza, M.V.N. Synthesis and antitumoral evaluation of 7-chloro-4-quinolinylhydrazones derivatives. *Med. Chem.*, **2011**, *7*, 599-604.
- World Health Organization/Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/> (Accessed March 12, 2016).
- Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, **2011**, *61*, 69-90.
- DeVita, V. T.; Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 8643-8653.
- Amim, R.S.; Firmino, G.S.S.; Rego, A.C.P.D.; Nery, A.L.; Da-Silva, S.A.G.; de Souza, M.V.N.; Pessoa, C.; Resende, J.A.L.C.; Figueroa-Villar, J.D.; Lessa, J.A. Cytotoxicity and leishmanicidal activity of isoniazid-derived hydrazones and 2-pyrazineformamide thiosemicarbazones. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2016**, *27*, 769-777.
- Abu-Dief, A.M.; Mohamed, I.M.A. A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef Univ. J. Appl. Sci.*, **2015**, *4*, 119-133.
- Da Silva, C.; Da Silva, D.L.; Modolo, L.V.; Alves, R.B.; De Resende, M.A.; Martins, C.V.B.; De Fátima, A. Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *J. Adv. Res.*, **2011**, *2*, 1-8.
- Yerigeni, M.C.; Murari, S.K.; Thimmaiah, K.N.; Math, S.K.S.; Vishwanath, B.S. Anti-tubercular and anti-inflammatory activities of azetidin-2-one derivatives and their effects on the activity of phospholipase A2. *Med. Chem.*, **2008**, *4*, 190-193.
- Utreja, D.; Vibha, S.; Singh, S.; Kaura, M. Schiff bases and their metal complexes as anti-cancer agents: a review. *Curr. Bioact. Compd.*, **2015**, *11*, 215-230.
- Costa, M.V.; Viana, G.M.; Souza, T.M.; Malta, L.F.B.; Aguiar, L.C.S. Copper-catalyzed C-N cross-coupling reactions for the preparation of aryl diamines applying mild conditions. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 2332-2335.
- Forge, D.; Cappoen, D.; Laurent, J.; Stanicki, D.; Mayence, A.; Huang, T.L.; Verschaevé, L.; Huygen, K.; Eynde, J.J.V. 1,4-Diarylpiperazines and analogs as anti-tubercular agents: Synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *49*, 95-101.
- Ferreira, M.L.; Candéa, A.L.P.; Henriques, M.G.M.O.; Lourenço, M.C.S.; Kaiser, C.R.; Souza, M.V.N. Evaluation of substituted benzaldehydes against *Mycobacterium tuberculosis*. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2010**, *7*, 754-758.
- Rodrigues, F.A.R.; Oliveira, A.C.A.; Cavalcanti, B.C.; Costa, M.P.; Pessoa, C.; Pinheiro, A.C.; Souza, M.V.N. Cytotoxic evaluation of substituted benzaldehydes. *Eur. Chem. Bull.*, **2014**, *3*, 555-558.
- Lessa, J.A.; Soares, M.A.; dos Santos, R.G.; Mendes, L.C.; Salum, L.B.; Daghestani, H.N.; Andricopulo, A.D.; Day, B.W.; Vogt, A.; Beraldo, H. Gallium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects and investigation on the interactions with tubulin. *Biomaterials*, **2013**, *26*, 151-165.
- Tetko, I.V.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V.A.; Radchenko, E.V.; Zefirov, N.S.; Makarenko, A.S.; Tanchuk, V.Y.; Prokopenko, V.V. Virtual Computational chemistry laboratory-design and description. *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **2005**, *19*, 453-463.
- Virtual Computational Chemistry Laboratory. <http://www.vcclab.org> (Accessed March 9, 2016).

- [31] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55-63.
- [32] Franzblau, S.G.; Witzig, R.S.; McLaughlin, J.C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M.T.; Cook, M.B.; Quenzer, V.K.; Ferguson, R.M.; Gilman, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362-366.
- [33] Vanitha, J.D.; Paramasivan, C.N. Evaluation of microplate Alamar blue assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *Microbiol. Infect. Dis.*, **2004**, *49*, 179-182.
- [34] Reis, R.S.; Neves Jr., I.; Lourenço, S.L.S.; Fonseca, L.S.; Lourenço, M.C.S. Comparison of flow cytometric and Alamar Blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2247-2248.