

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

PEDRO HENRIQUE SALGADO MARCON

**Síntese, caracterização e atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de duas
novas tiossemicarbazonas**

Versão Corrigida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
31/07/2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

PEDRO HENRIQUE SALGADO MARCON

Síntese, caracterização e atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de duas novas tiossemicarbazonas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Química)

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Esposito

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M321s Marcon, Pedro Henrique Salgado
Síntese, caracterização e atividade
antiproliferativa contra linhagens tumorais de duas
novas tiossemicarbazonas / Pedro Henrique Salgado
Marcon. - São Paulo, 2023.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Esposito, Breno Pannia

1. tiossemicarbazonas. 2. atividade
antiproliferativa. 3. HeLa. 4. HepG2. 5. quelantes.
I. T. II. Esposito, Breno Pannia, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Síntese, caracterização e atividade antiproliferativa contra
linhagens tumorais de duas novas tiossemicarbazonas"

PEDRO HENRIQUE SALGADO MARCON

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Breno Pannia Esposito
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Giselle Cerchiaro
UFABC

Prof. Dr. Wendel Andrade Alves
UFABC

SÃO PAULO
17 de agosto de 2023

Dedico este trabalho a Sariêro,
nós para sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Paulo, Raquel, Dani, Bucki e Millie por apoiarem a aventura da Pós-Graduação na USP, seu amor serviu de combustível para continuar a caminhada, além todo o apoio e atenção durante toda a minha vida, a distância até Brasília fica pequena quando se nasce nos Salgado Marcon.

Ao professor Breno Pannia Esposito, que abriu as portas de Universidade de São Paulo para que eu pudesse continuar seguindo meu sonho, pela orientação, motivação, amizade e ajuda dentro do projeto.

Aos amigos que fiz no LAQBAM, me ajudando dentro e fora do laboratório, que nossas dinâmicas nunca expirem. Obrigado Gabriel, Monalisa, Ernani, Tati, Lucio e especialmente Júlia e Rita pela assistência e execução dos ensaios de viabilidade celular.

Às grandes amigas que se estreitaram ainda mais em São Paulo, pelo apoio e compressão de inúmeras formas dentro da Terra da Garoa, Leonardo, Anna Bia, Gabriele e Clara, além do presente mais gratificante de todos, Alice, do complexo de Édipo até os complexos metálicos, enfim, por tudo, *meu amiros*.

A todos os funcionários, técnicos e demais professores da USP por suas contribuições durante esta parte da minha jornada acadêmica.

À Central Analítica do IQUSP, por todas as análises realizadas e pelo treinamento avançado para operar o equipamento de RMN.

Ao CNPq, pela bolsa e fomento necessário para a execução do projeto de mestrado.

RESUMO

MARCON, Pedro H.S. **Síntese, caracterização e atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de duas novas tiossemicabazonas**. 2023. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

As tiossemicabazonas têm recebido atenção devido à sua variedade de propriedades biológicas. Sua diversidade de efeitos, como atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antineoplásicas, motiva a exploração e investigação de numerosos compostos dentro dessa classe. Os complexos de íons metálicos de ferro, cobre, zinco, níquel, platina, ouro e entre outros, com as tiossemicabazonas são interesse de pesquisa dentro da área da química bioinorgânica, pelo fato de apresentarem atividades e mecanismos de ação *in vitro* contra células de câncer. Este trabalho relata a síntese, caracterização e atividade antiproliferativa de duas novas moléculas da classe das tiossemicabazonas: pentano-1,5-diilidenobis(N-metilhidrazina-1-carbotioamida) [H_2L^1] e pentano-1,5-diilidenobis(N-benzilhidrazina-1-carbotioamida) [H_2L^2]. Ambos os compostos foram totalmente caracterizados através de temperatura de fusão, análise elementar (para carbono, hidrogênio e nitrogênio), espectroscopia de infravermelho (FTIR), espectroscopia de absorção UV-Vis, ressonância magnética nuclear de prótons (1H) e carbono-13 (^{13}C) e espectrometria de massas por ionização por spray de elétrons (ESI-MS). O ensaio de viabilidade celular foi realizado contra linhagens de células tumorais HeLa (câncer cervical) e HepG2 (câncer de fígado humano). H_2L^1 possui uma maior atividade antiproliferativa quando comparada a H_2L^2 contra ambas as linhagens de células tumorais estudadas; a diferença entre os dois perfis provavelmente se deve à variação estrutural entre as moléculas, uma vez que a única diferença é a mudança do grupo terminal metil para o benzil. O IC_{50} para H_2L^1 está em baixas concentrações micromolares, mostrando-se mais citotóxico que a cisplatina contra a linhagem HeLa, enquanto demonstra uma citotoxicidade semelhante à da cisplatina contra HepG2; H_2L^2 não demonstrou citotoxicidade relevante, visto que seu IC_{50} tem valores maiores que $100\mu M$.

Palavras-chave: tiossemicabazonas, atividade antiproliferativa, HeLa, HepG2, quelantes

ABSTRACT

MARCON, Pedro H.S. **Synthesis, characterization and anti-proliferative activity against tumoral cell lines of two new thiosemicarbazones.** 2023. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Thiosemicarbazones have gathered attention due to their variety of biological properties. Their diverse effects, such as bactericidal, antiviral, antifungal, and antineoplastic activities, motivate exploration and investigation of numerous compounds within this class. Complexes of metal ions such as iron, copper, zinc, nickel, platinum, gold, among others, with thiosemicarbazones are subjects of research in the field of bioinorganic chemistry due to their *in vitro* activities and mechanisms of action against cancer cells. This work reports the synthesis, characterization, and anti-proliferative activity of two novel molecules of the thiosemicarbazone class: pentane-1,5-diylidenebis(*N*-methylhydrazine-1-carbothioamide) [H_2L^1] and pentane-1,5-diylidenebis(*N*-benzylhydrazine-1-carbothioamide) [H_2L^2]. Both compounds were fully characterized through melting point, elemental analysis (for carbon, hydrogen, and nitrogen), infrared spectroscopy (FTIR), UV-Vis absorption spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance (1H NMR), carbon-13 NMR (^{13}C NMR) and electron spray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The cell viability assay was conducted against HeLa (cervical cancer) and HepG2 (human liver cancer) cell lines. H_2L^1 exhibits higher anti-proliferative activity compared to H_2L^2 against both studied tumor cell lines; the difference in their profiles is likely due to structural variation between the molecules, as the only distinction is the change from a methyl to a benzyl terminal group. The IC_{50} for H_2L^1 is at low micromolar concentrations, showing greater cytotoxicity than cisplatin against HeLa, while demonstrating similar cytotoxicity to cisplatin against HepG2; H_2L^2 did not show relevant cytotoxicity, as its IC_{50} comprises values greater than $100\mu M$.

Keywords: thiosemicarbazones, antiproliferative activity, HeLa, HepG2, chelators

LISTA DE ABREVIATURAS

3-AP	Tiossemicarbazonas derivadas da 3-aminopiridina-carboxialdeído
ACN	Acetonitrila
bpy	2,2'-bipiridina
bzTSZ	N(4)-benziltiossemicarbazida
CCDC	Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
COVID-19	Doença por coronavírus 2019
DFO	Desferrioxamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DpT	Tiossemicarbazonas derivadas da dipiridilcetona
ESI	Ionização por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
GTA	Glutaraldeído
H ₂ L ¹	1,5-pentanodial-bis(N(4)-metiltiossemicarbazona)
H ₂ L ²	1,5-pentanodial-bis(N(4)-benziltiossemicarbazona)
HeLa	Células de câncer de colo do útero
HepG2	Células de câncer de fígado humano
HPV	Papilomavírus Humano
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% de células
LIP	<i>Labile Iron Pools</i>
MCF-7	Células de câncer de mama
MTS	Método colorimétrico
mTSZ	N(4)-metiltiossemicarbazida

NADH/NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PCT	Tiossemicarbazonas derivadas da piridina-carboxialdeído
PDB	Banco de Dados de Proteínas
PR	Proteína receptora de progesterona
ROS	Reactive oxygen species
RR	Ribonucleotídeo redutase (enzima)
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
TGR	Tioredoxina-glutationa redutase (enzima)
topII α	Topoisomerase II α (enzima)
TSZ	Tiossemicarbazona
δ	Deslocamento químico
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Lista de reagentes e solventes

TABELA 4.1. Valores calculados e experimentais de análise elementar para a síntese inicial do GTA-mTSZ.

TABELA 4.2. Hipótese da formação do composto GTA-bis(mTSZ), utilizando o mesmo resultado da última análise de CHN, mas comparando com os novos valores teóricos.

TABELA 4.3. Análise elementar, temperatura de fusão e rendimento do composto H_2L^1 , assim como sua fórmula molecular e massa molar.

TABELA 4.4. Números de onda (cm^{-1}) dos modos vibracionais mais relevantes das ligações do composto H_2L^1 .

TABELA 4.5. Valores de deslocamento químico, integração, suas multiplicidades e a atribuição dos átomos de 1H de H_2L^1 .

TABELA 4.6. Valores de deslocamento químico e as atribuições para os núcleos de ^{13}C obtidos para H_2L^1 .

TABELA 4.7. Análise elementar, temperatura de fusão e rendimento do composto H_2L^2 , assim como sua fórmula molecular e massa molar.

TABELA 4.8. Frequências (cm^{-1}) dos modos vibracionais mais relevantes das ligações do composto H_2L^2 .

TABELA 4.9. Valores de deslocamento químico, integração, suas multiplicidades e a atribuição dos átomos de 1H de H_2L^2 .

TABELA 4.10. Valores de deslocamento químico e as atribuições para os núcleos de ^{13}C obtidos para H_2L^2 .

TABELA 4.11. Valores de IC_{50} apresentando a atividade citotóxica dos compostos H_2L^1 e H_2L^2 , em μM , contra as células de câncer de colo do útero (HeLa) e câncer de fígado humano (HepG2).

TABELA 4.12. Dados do Job's Plot para H_2L^1 e o sal $H[AuCl_4] \cdot 3H_2O$. A concentração máxima de ambas as soluções foi de $0,66 \cdot 10^{-3} M$ e o solvente utilizado foi etanol. X corresponde a fração molar do H_2L^1 . A mesma tabela também serve para descrever o experimento realizado com H_2L^2 , já que todas as concentrações foram as mesmas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estimativa de incidência (azul) e mortalidade (vermelho) de tumores malignos no mundo em 2020 em homens e mulheres normalizando todas as idades. Fonte: GLOBOCAN 2020; Agência Internacional de Pesquisa em Câncer.

FIGURA 1.2. Representação geral de uma base de Schiff (R^1 , R^2 , R^3 = grupo alquila, arila ou outras funcionalizações).

FIGURA 1.3. Esquema geral da síntese de uma tiossemicarbazona. Ocorre a partir da condensação da carbonila pelo nitrogênio mais básico da tiossemicarbazida, formando a imina. (R = grupo alquila, arila, átomo de hidrogênio ou outras funcionalizações).

FIGURA 1.4. Exemplos de tiossemicarbazonas que possuem interessantes perfis de atividade contra uma série de agentes causadores de doenças.

FIGURA 1.5. Estrutura geral das PCTs (piridina-carboxialdeído tiossemicarbazonas; BOOTH, 1971) e o centro dinuclear de ferro da subunidade R2 da RR. Fonte: Imagem à direita retirada de Kolberg, 2004.

FIGURA 1.6. Representação da estrutura da 3-AP, à esquerda, e da DFO, à direita.

FIGURA 1.7. Esquema do mecanismo de atuação proposto para as TSZ derivadas da dipiridilcetona. Fonte: Adaptado de Kalinowski, 2009.

FIGURA 1.8. Estrutura molecular dos metalofármacos a base de platina e os respectivos anos quando foram aprovados para uso clínico. Fonte: Khoury, 2020; De Lira-Quezada, 2021; Ghosh, 2019.

FIGURA 1.9. Estruturas dos complexos de Rutênio (III) e de Rutênio(II).

FIGURA 1.10. Estrutura da auranofina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para clareza. Fonte: Adaptado de D.T. Hill, 1980. Dados cristalográficos disponíveis em CCDC: 1101703.

FIGURA 1.11. Aduto da TGR com o produto da auranofina (à esquerda) e o Au^I coordenado a resíduos de cisteína da enzima em um dos três sítios de interação, inibindo a atividade enzimática (à direita). Fonte: Código PDB: 3H4K.

FIGURA 1.12. Alguns dos complexos de ouro(III) explorados por Kim, Olelewe e colaboradores. Fonte: Kim, 2019; Olelewe, 2022.

FIGURA 1.13. À esquerda, os modos de interação intermoleculares preditos para o composto estudado como potencial inibidor da cruzaina. À direita, uma representação do complexo de ouro(III) sintetizado pelos autores. Fonte: Rettondin, 2016.

FIGURA 1.14. À esquerda, os modos de interação intermoleculares preditos para o composto estudado frente à PR. À direita, uma representação do complexo de ouro(III) organometálico sintetizado pelos autores. Fonte: Almeida, 2022.

FIGURA 3.1. Esquema da síntese do ligante H_2L^1 .

FIGURA 3.2. Esquema da síntese do ligante H_2L^2 .

FIGURA 4.1. Estruturas moleculares dos quelantes de ferro aprovados para uso clínico no tratamento de doenças de sobrecarga de ferro e pensados como ligantes para a síntese de complexos de ouro. Em sequência: mesilato de desferrioxamina, deferiprona e deferasirox.

FIGURA 4.2. Representações moleculares dos conjugados de desferrioxamina com aminas aromáticas, cafeína e peptídeos. Fonte: Adaptados de Goswami, 2014; Li, 2019; Carvalho, 2021.

FIGURA 4.3. Esquema que representa os reagentes de partida e a molécula final que combina a DFO, glutaraldeído (GTA) e tiossemicabazida. (R = grupo metila ou benzila).

FIGURA 4.4. Esquema geral da síntese da molécula de interesse DFO-GTA-mTSZ, partindo da síntese do intermediário destacado em vermelho, o DFO-GTA.

FIGURA 4.5. Possíveis formas do glutaraldeído em solução. Fonte: Adaptado de Migneault, 2004.

FIGURA 4.6. Esquema geral da síntese da molécula de interesse DFO-GTA-mTSZ, partindo da síntese do intermediário destacado em azul, o GTA-mTSZ.

FIGURA 4.7. Estrutura molecular do GTA-bis(mTSZ), resultante da dupla condensação das carbonilas do aldeído.

FIGURA 4.8. Mecanismo de reação proposto para a síntese do ligante H_2L^1 .

FIGURA 4.9. Espectro de infravermelho de H_2L^1 e o número de onda (cm^{-1}) dos modos vibrationais das ligações mais relevantes.

FIGURA 4.10. Espectro de absorção UV-Vis da solução de H_2L^1 e 4-metil-3-tiossemicarbazida (mTSZ).

FIGURA 4.11. Espectro de RMN de ^1H de H_2L^1 (em DMSO-d_6 , 7T).

FIGURA 4.12. Espectro de RMN de ^{13}C de H_2L^1 (em DMSO-d_6 , 11,74T).

FIGURA 4.13. Espectro ESI(+)-MS para H_2L^1 e as estruturas de fragmentações e sinais mais relevantes.

FIGURA 4.14. Mecanismo de reação proposto para a síntese do ligante H_2L^2 .

FIGURA 4.15. Espectro de infravermelho de H_2L^2 e a frequência (cm^{-1}) dos modos vibracionais das ligações mais relevantes.

FIGURA 4.16. Espectro de absorção UV-Vis da solução de H_2L^2 e 4-benzil-3-tiossemicarbazida (bzTSZ).

FIGURA 4.17. Espectro de RMN de ^1H de H_2L^2 (em DMSO-d_6 , 11,74T).

FIGURA 4.18. Espectro de RMN de ^{13}C de H_2L^2 (em DMSO-d_6 , 11,74T).

FIGURA 4.19. Espectro ESI(+)-MS para H_2L^2 e a estrutura mais abundante do seu espectro de massas.

FIGURA 4.20. Efeitos de H_2L^1 e H_2L^2 na viabilidade das células de HeLa e HepG2. As células foram incubadas por 24 horas com concentrações que variaram de 3,125 μM até 100 μM , utilizando o ensaio colorimétrico MTS para avaliar a viabilidade. Os dados representam a média de três experimentos independentes e seus desvios padrão.

FIGURA 4.21. Estudo da estequiometria dos complexos formados entre o sal de ouro(III) (representado pela linha vermelha) e o ligante H_2L^1 (representado pela linha preta).

FIGURA 4.22. Estudo da estequiometria dos complexos formados entre o sal de ouro(III) (representado pela linha verde) e o ligante H_2L^2 (representado pela linha preta).

FIGURA 4.23. Esquema da reação de complexação pretendida entre os sais de ouro(III) e os ligantes H_2L^1 (R = metila) e H_2L^2 (R = benzila).

FIGURA 4.24. Esquema de síntese para a formação do complexo de ouro(III) utilizando a estratégia da bpy como um ligante estabilizador do centro metálico.

FIGURA 4.25. Espectro de RMN de ^1H para $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$. Destacado em vermelho estão os deslocamentos químicos dos sinais da bipyridina livre, enquanto os deslocamentos correspondentes à molécula coordenada estão mais desblindados e com maior intensidade.

FIGURA 4.26. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$, em preto e do produto final da síntese, em vermelho.

FIGUTA 4.27. Espectro ESI(+)-MS do produto final da síntese dos complexos.

FIGURA 4.28. Representações das estruturas **(A)**, **(B)** e **(C)** de caráter hipotético para propor uma solução para o problema da síntese dos complexos de ouro de objetivo do trabalho.

FIGURAL 4.29. Espectro ESI(+)-MS do produto da reação de 5 minutos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1. Materiais e Métodos.....	34
3.1.1. Reagentes e Solventes	34
3.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho	34
3.1.3. Análise Elementar	34
3.1.4. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível	34
3.1.5. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	35
3.1.6. Temperatura de Fusão	35
3.1.7. Espectrometria de Massas	35
3.1.8. Método das Variações Contínuas (Job's Plot).....	35
3.1.9. Análise Biológica.....	36
3.1.9.1. Cultura de células	36
3.1.9.2. Ensaio de viabilidade celular (ensaio MTS)	36
3.1.10. Síntese dos adutos de DFO.....	36
3.1.10.1. Primeira rota para a síntese de DFO-GTA-mTSZ.....	37
3.1.10.2. Segunda rota para a síntese de DFO-GTA-mTSZ.....	37
3.2. Sínteses das Tiossemicarbazonas.....	37
3.2.1. Síntese do composto pentano-1,5-diilidenobis(<i>N</i> -metilhidrazina-1-carbotioamida) $[\text{H}_2\text{L}^1]$	38
3.2.2. Síntese do composto pentano-1,5-diilidenobis(<i>N</i> -benzilhidrazina-1-carbotioamida) $[\text{H}_2\text{L}^2]$	38
3.3. Sínteses dos Complexos	39
3.3.1. Transformação do reagente inicial de ouro(III) do ácido $\text{H}[\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ para o sal $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$	39
3.3.2. Síntese do sal $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$	39

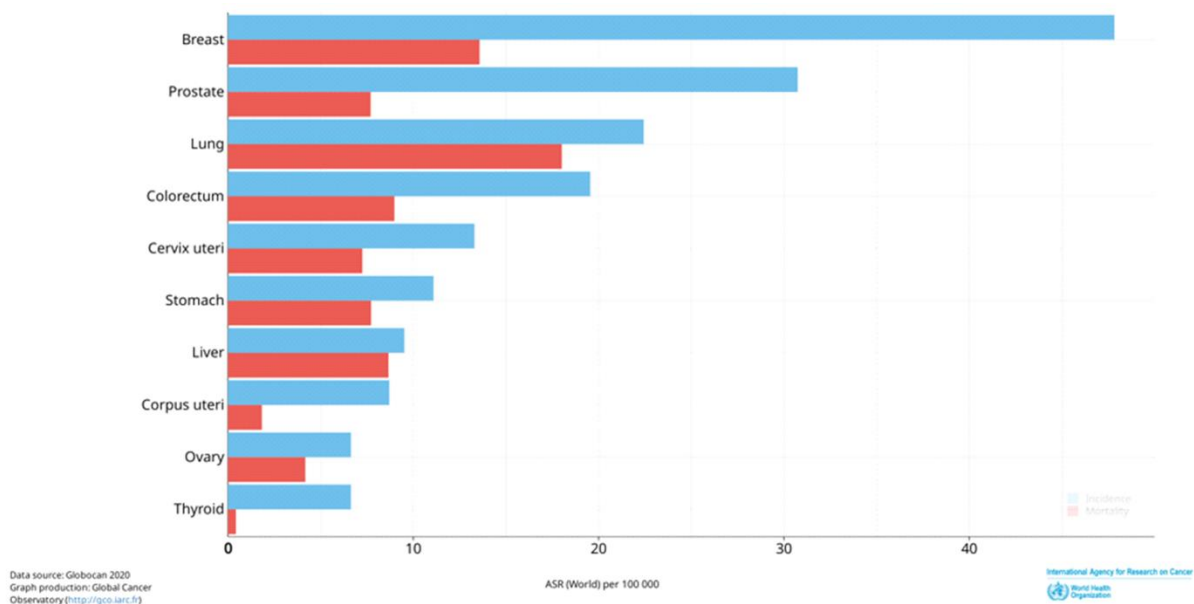
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Caracterização da estrutura molecular de H₂L¹.....	47
4.1.1. Rendimento, Temperatura de Fusão e Análise Elementar para H₂L¹	47
4.1.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para H₂L¹ 48	
4.1.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta para H₂L¹	49
4.1.4. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C para H₂L¹	51
4.1.5. Espectrometria de Massas para H₂L¹.....	53
4.2. Caracterização da estrutura molecular de H₂L².....	55
4.2.1. Rendimento, Ponto de Fusão e Análise Elementar para H₂L²	55
4.2.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para H₂L² 56	
4.2.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta para H₂L²	57
4.2.4. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C para H₂L²	58
4.2.5. Espectrometria de Massas para H₂L².....	62
4.3. Avaliação da atividade antiproliferativa nos ensaios de viabilidade celular para H₂L¹ e H₂L².....	63
4.4. Possibilidade de síntese de complexos de ouro utilizando os ligantes H₂L¹ e H₂L² 64	
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	73
6. REFERÊNCIAS	76
7. APÊNDICES.....	83
SÚMULA CURRICULAR.....	92

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os tumores malignos são agentes que despertam grandes preocupações da comunidade e dos órgãos de saúde internacional, já que o número de casos é crescente a cada ano em torno de todo o globo (Sung, 2021). Atualmente, o câncer é a doença que mais gera óbitos no planeta atingindo a marca de 10 milhões de vítimas, ou uma em cada seis mortes em 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (Sung, 2021). Os tipos de câncer mais comuns no ano de 2020 foram os de mama, pulmão, colorretal e próstata sendo que os tipos que mais causaram mortes foram de pulmão, mama, colorretal, fígado e estômago (WHO, 2022) (Figura 1.1).

FIGURA 1.1. Estimativa de incidência (azul) e mortalidade (vermelho) de tumores malignos no mundo em 2020 em homens e mulheres normalizando todas as idades.



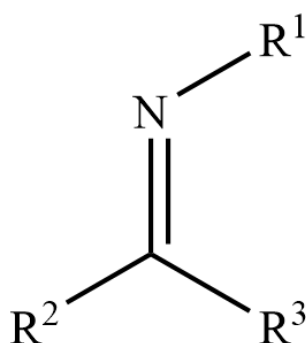
Fonte: GLOBOCAN 2020; Agência Internacional de Pesquisa em Câncer.

As infecções virais também são uma causa comum no desenvolvimento de tumores, sendo responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de cânceres em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos em 2018. Os exemplos mais importantes destes casos são os cânceres cervicais e de fígado que são desenvolvidos devido as infecções pelo papilomavírus humano (HPV) e hepatite, respectivamente (De Martel, 2020). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o triênio 2023 a 2025 a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer no Brasil, com o maior número de incidências sendo o câncer de pele não melanoma (220 mil, 31,3%), mama (74 mil, 10,5%), próstata (72 mil, 10,2%), colorretais (46 mil, 6,5%), pulmão (32 mil, 4,6%) e estômago (21 mil, 3,1%) (INCA, 2022).

Dentre as principais formas de intervenção contra o câncer a quimioterapia é a mais utilizadas de todas. Este tratamento consiste no emprego de fármacos com atividade antitumoral visando a diminuição do tamanho do câncer e então a utilização de outras técnicas com a radioterapia ou cirurgia, ou até a remissão total. O grande problema encontrado durante a intervenção quimioterápica para a adesão de pacientes são os seus efeitos colaterais ruins (Lee, 2018) e disponibilidade de medicamentos, tanto por serem caros e pelo fato da baixa quantidade de novas moléculas aprovadas para tratar esta doença, visto que desde a década de 1980 até 2019, somente 126 novos medicamentos foram aprovados para o tratamento de câncer pela FDA (The ASCO Post, 2019), agência federal estadunidense, de referência mundial, que dentre uma de suas funções, regulariza a aprovação e comercialização de medicamentos.

Há várias fontes de pequenas moléculas para o tratamento de tumores via quimioterapia e dentre elas, as bases de Schiff (Figura 1.2) estão inseridas no escopo visado pela química bioinorgânica e inorgânica medicinal quando o assunto se trata do desenvolvimento de novos compostos bioativos. As bases de Schiff são moléculas versáteis e derivatizáveis que dão origem a diversas subclasses também biologicamente ativas e como característica principal contêm o grupo C=N (imina ou azometina), imprescindível para a sua bioatividade (Da Silva, 2011) como antibacterianos, antimaláricos, antivirais e antitumorais (Pavan, 2010). As bases de Schiff, que são bases de Lewis devido à sua capacidade de doar pares de elétrons, são produtos da condensação entre um composto carbonílico (aldeído ou cetona) e uma amina (Gupta, 2022) e foram assim nomeadas pelos estudos do químico alemão Hugo Schiff em 1864.

FIGURA 1.2. Representação geral de uma base de Schiff (R^1 , R^2 , R^3 = grupo alquila, arila ou outras funcionalizações).

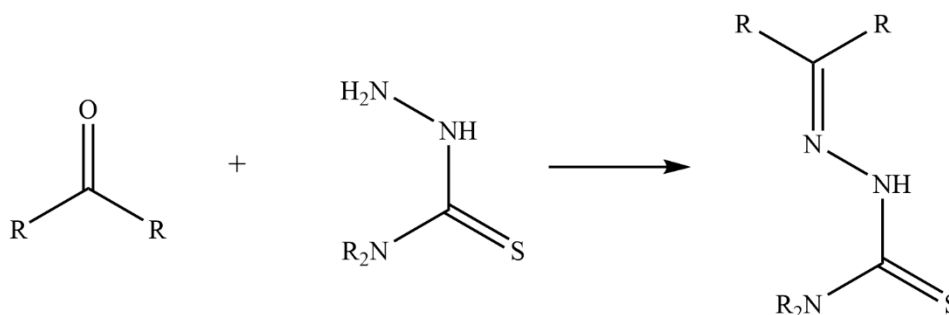


Além disso, dentro dessa família de iminas existem subclasses de compostos com novas formações estruturais e propriedades farmacológicas pronunciadas. Agregando ao grande leque das bases de Schiff, há várias moléculas com outras conexões entre átomos e trazem consigo

outras identidades como átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre, selênio, entre outros, podendo também atuar como agentes complexantes em complexos metálicos de interesse para a química inorgânica medicinal.

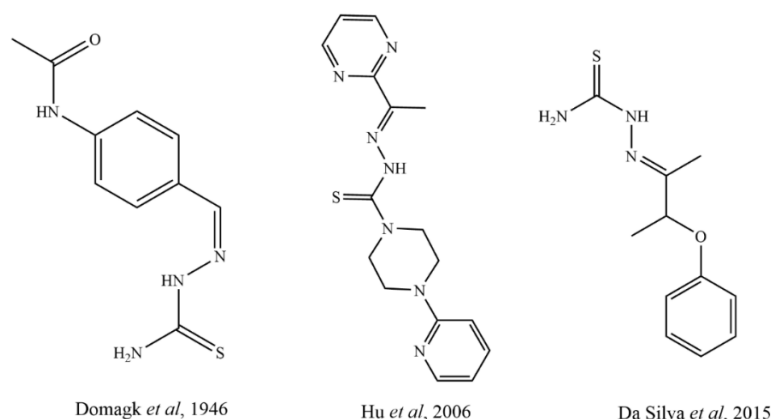
Uma das subclasses, e essa de interesse da investigação deste trabalho, é a classe das tiossemicarbazonas (TSZs; Figura 1.3). Começaram a ser estudadas em 1946 por Domagk e colaboradores (pesquisa fruto do trabalho iniciado de seu prêmio Nobel em 1939 com a descoberta da atividade bactericida de sulfonamidas) devido ao seu perfil bactericida contra a *M. tuberculosis* (Domagk, 1946). São compostos orgânicos sintetizados a partir da condensação de um composto carbonílico com o grupo da hidrazina de uma tiossemicarbazida.

FIGURA 1.3. Esquema geral da síntese de uma tiossemicarbazona. Ocorre a partir da condensação da carbonila pelo nitrogênio mais básico da tiossemicarbazida, formando a imina. (R = grupo alquila, arila, átomo de hidrogênio ou outras funcionalizações).



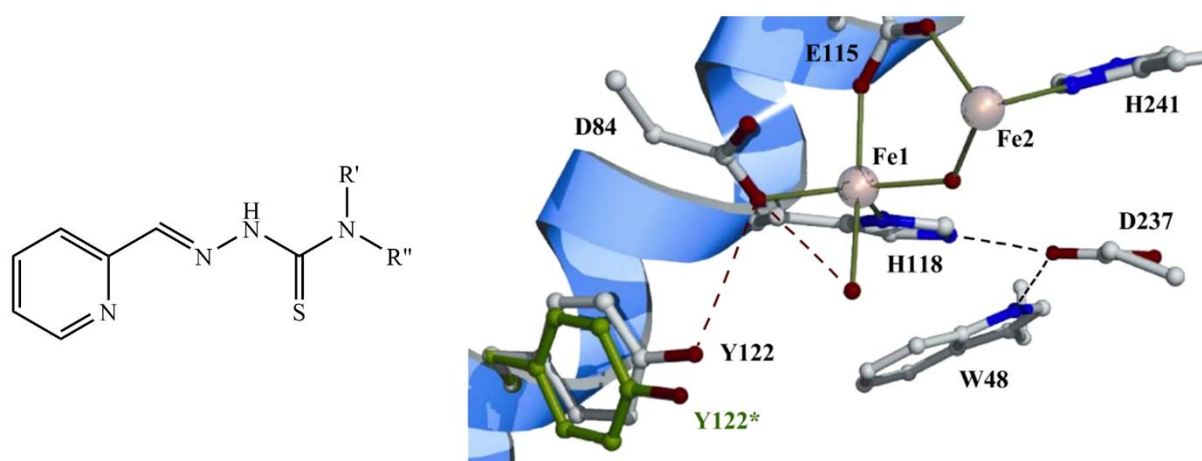
Outros estudos reportam os resultados de alguns exemplos de estruturas moleculares diferentes de tiossemicarbazonas com atividades antitumorais (Hu, 2006) e larvicidas, essa contra o mosquito transmissor da dengue, o *Aedes aegypti* (Da Silva, 2015) (Figura 1.4). É possível perceber como essa classe de moléculas orgânicas é versátil em relação as transformações estruturais e de perfis farmacológicos possíveis.

FIGURA 1.4. Exemplos de tiossemicarbazonas que possuem interessantes perfis de atividade contra uma série de agentes causadores de doenças.



Apesar das atividades biológicas das tiossemicarbazonas serem conhecidas desde os primeiros trabalhos de Domagk, o seu mecanismo de ação só começou a ser desvendado a partir da década de 60, sugerindo uma rota que envolvia a inibição da biossíntese do DNA (Booth, 1967). Foi então que, ao desenvolver novas moléculas para continuar os estudos de mecanismos de ação, Booth e colaboradores deram mais um passo para chegar mais perto da resolução do problema. A investigação da família das tiossemicarbazonas derivadas da piridina-carboxialdeído, as PCTs (Figura 1.5), gerou resultados interessantes: células tumorais tratadas com PCT não conseguiram converter ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, inviabilizando a formação dos blocos de construção do DNA, processo esse que é catalisado pela enzima ribonucleotídeo redutase (RR) (Booth, 1971). Esta metaloenzima contém dois íons de ferro num par $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ (Figura 1.5) que são essenciais para a sua atividade catalítica (Kolberg, 2004). Os autores, então há época, levantaram algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação: As PCTs poderiam se coordenar aos íons de ferro do sítio ativo enzimático acarretando em sua inatividade, ou então, agindo como quelantes, se ligariam aos ferros livres encontrados nas ditas LIP, *labile iron pools*, assim formando complexos metálicos de características pró-oxidantes que danificariam a célula tumoral por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (Moore, 1971).

FIGURA 1.5. Estrutura geral das PCTs (piridina-carboxialdeído tiossemicarbazonas) (Booth, 1971) e o centro dinuclear de ferro da subunidade R2 da RR (Kolberg, 2004).

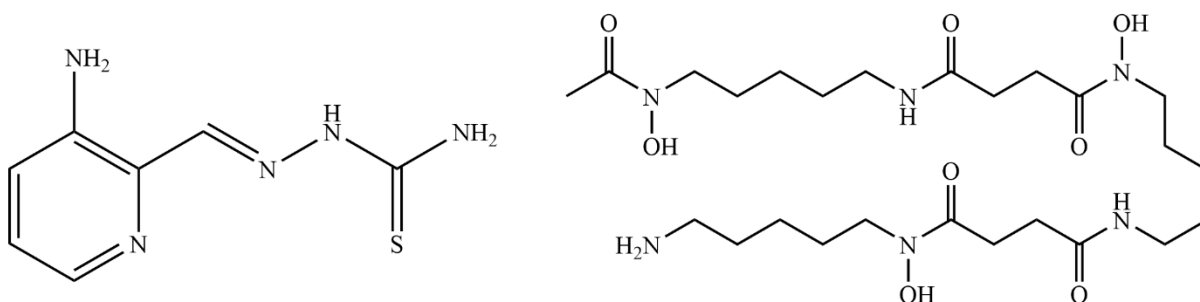


Fonte: Imagem à direita retirada de Kolberg, 2004.

Os experimentos, curiosidade e trabalho dispendidos para continuar entendendo este mecanismo instigaram grupos ao redor do mundo, com todos contribuindo para o avanço que permeava a questão. Utilizando TSZs derivadas da 3-aminopiridina-carboxialdeído (3-AP; Figura 1.6), Finch e colaboradores levaram esta nova molécula até a fase II de testes clínicos, a

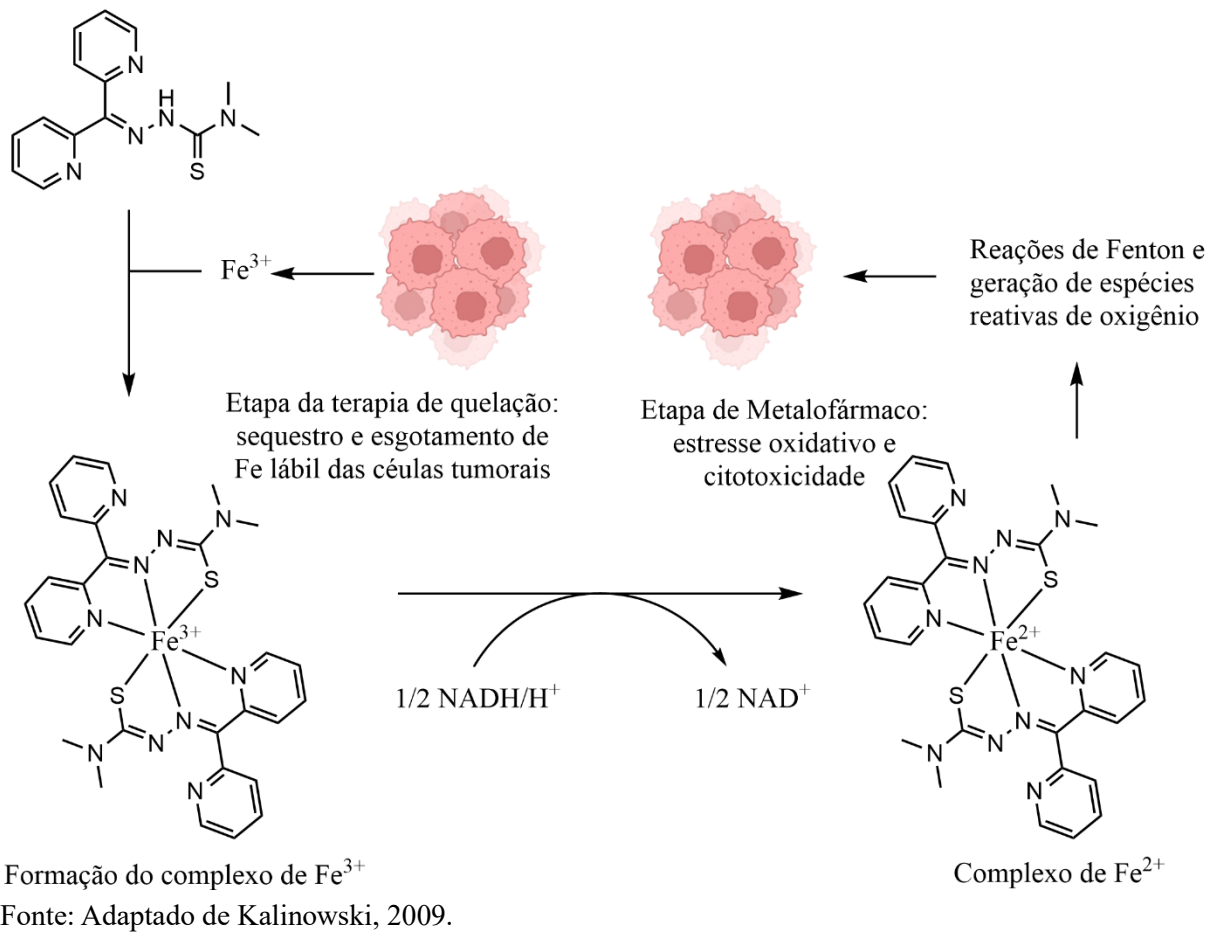
única tiossemicarbazona que passou pelo extenso crivo do tratamento experimental (Finch, 2000). Durante o estudo, a 3-AP foi descrita como um inibidor de RR, porém, Shao *et al* mostraram que a inibição de RR proposta era resultado da supressão do radical tirosilo (resíduo importante no processo redox enzimático) da subunidade R2 da RR mediada por espécies reativas de oxigênio, que por sua vez foram geradas por complexos de Fe(II)-3-AP, assim, inativando a enzima (Shao, 2006). A outra molécula com afinidade por metais que chegou a ser estudada em algum teste clínico como antitumoral foi a desferrioxamina (DFO; Figura 1.6), mas sua baixa eficácia fez cessar os testes, pois realmente não foi projetada para ser um medicamento para o tratamento oncológico. Contudo, a DFO abriu caminhos para o design de novos candidatos a fármacos quelantes.

FIGURA 1.6. Representação da estrutura da 3-AP, à esquerda, e da DFO, à direita.



Uma série interessante de tiossemicarbazonas derivadas da DpT (dipiridilcetona) foi desenvolvida especificamente como quelantes de ferro para o tratamento de câncer (Whitnall, 2006), já que a literatura continha inúmeros exemplos da importância que a formação de complexos tem para a inibição de RR (Kalinowski, 2009) e a eventual morte celular dos tumores (Beraldo, 2005). Os DpTs podem agir por meio de uma combinação de estratégias terapêuticas: a terapia de quelação e como metalofármaco (Yuan, 2004). Em processos seguidos, a DpT sequestra os íons de ferro lábeis intracelulares atacando diretamente o metabolismo da célula e este novo composto de coordenação gerado *in loco* induz a formação de ROS por meio da reciclagem redox de ferro (Figura 1.7).

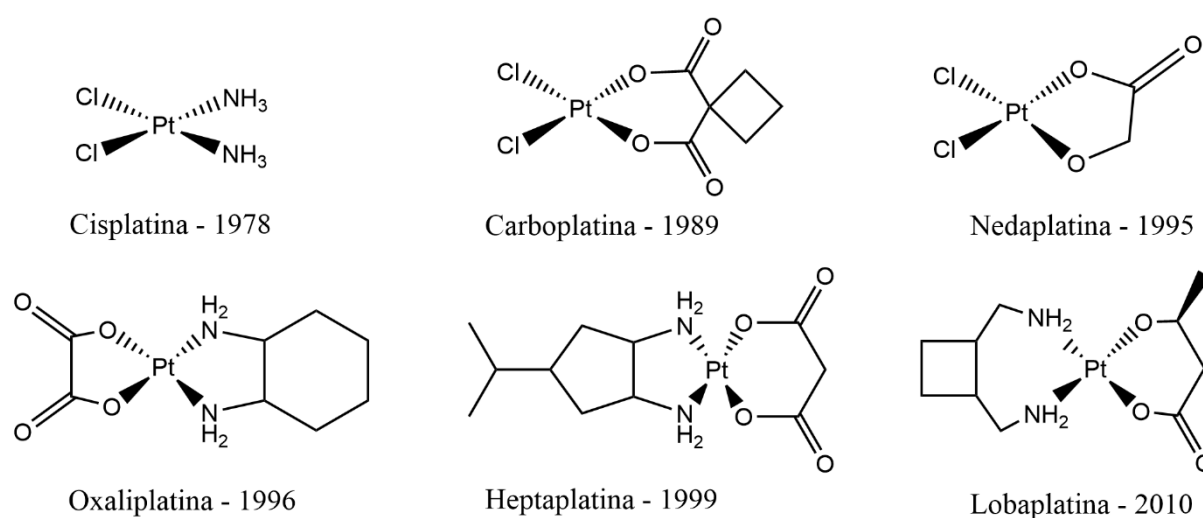
FIGURA 1.7. Esquema do mecanismo de atuação proposto para as TSZ derivadas da dipiridilcetona.



Novamente, é possível perceber a versatilidade que as tiossemicarbazonas exibem: ampla possibilidade de conformações estruturais, diversos mecanismos de ação e a interface que fazem dentro da química medicinal ao atuarem como compostos orgânicos bioativos e também como ligantes formando complexos inorgânicos importantes que desencadeiam outros caminhos terapêuticos. Além dos mecanismos exibidos que envolvem a formação de compostos baseados em ferro, as DpTs também inibem seletivamente a enzima DNA topoisomerase II α , atuando como um veneno ao complexo DNA-topII α (Rao, 2009). Ou seja, é bem descrito na literatura o papel protagonizado pelas bases de Schiff, em especial as tiossemicarbazonas, como candidatos a se tornarem novos medicamentos para o tratamento de diversas doenças, principalmente o câncer. Atuando de forma livre ou coordenados a metais, esta classe de moléculas impulsiona o desenvolvimento da pesquisa científica com o objetivo de melhorar a qualidade de vida das pessoas portadoras de câncer, por meio de novos quimioterápicos potentes a serem usados em tratamentos oncológicos eficientes.

A química bioinorgânica é uma das vertentes do estudo e da pesquisa química que propõe entender a função que os íons metálicos têm em um ambiente fisiológico, da sua assimilação até suas interações com biomoléculas (Farrel, 1999). Quando Rosenberg descobriu a atividade antineoplásica da molécula cis-diaminocloroplatina (II) (Rosenberg, 1965; Figura 1.8), e esta foi aprovada como medicamento em 1978, teve início um intenso movimento da comunidade científica focada no desenvolvimento de novos metalofármacos, um dos carros-chefe na área de pesquisa da química inorgânica medicinal.

FIGURA 1.8. Estrutura molecular dos metalofármacos a base de platina e os respectivos anos quando foram aprovados para uso clínico.

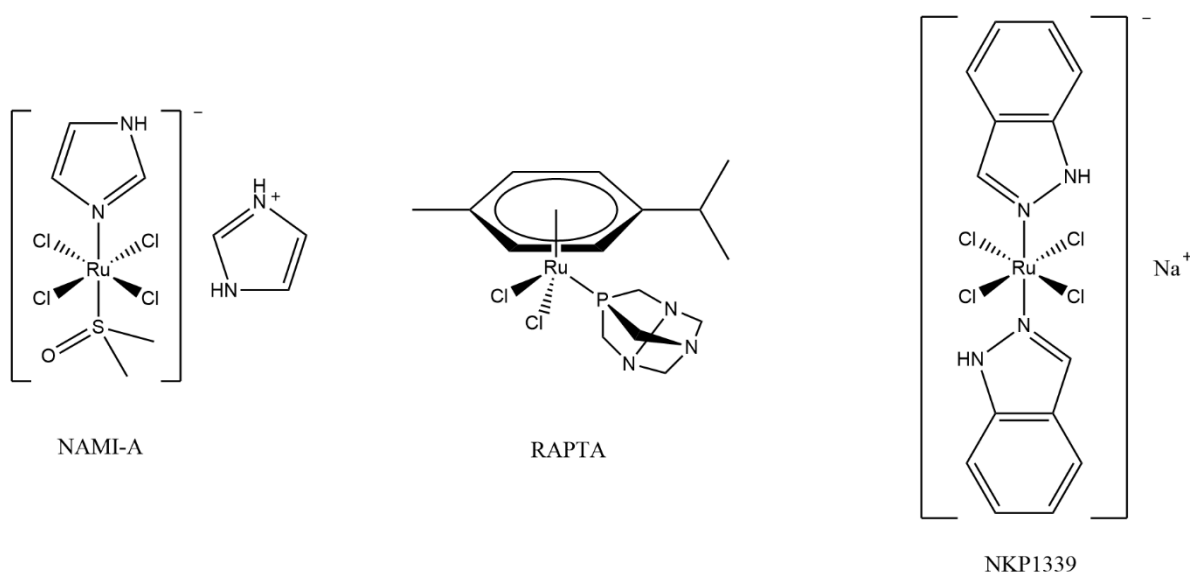


Fonte: Khoury, 2020; De Lira-Quezada, 2021; Ghosh, 2019.

Acompanhada da grande descoberta do potencial biológico que os complexos metálicos exibem, por exemplo, contra bactérias, tumores e fungos (Huayhuaz, 2017; Santiago, 2019; Schwartz, 2001), há também um grande obstáculo a ser vencido: sua citotoxicidade sistêmica. Os íons de metais de transição são altamente reativos e podem interagir quimicamente com uma variada gama de moléculas biológicas, orgânicas e inorgânicas, resultando em uma baixa especificidade pelo seu alvo terapêutico e atacando indiscriminadamente as células saudáveis (De Paiva, 2020). Infelizmente, a consequência desse perfil de atuação indiferenciado é a resistência medicamentosa criada por microrganismos e tumores ao tratamento quimioterápico, situação recorrente passada com os metalofármacos de platina(II) (Makovec, 2019; Wang, 2018) e a gama de efeitos colaterais deletérios, tornando o procedimento oncológico extremamente desgastante, podendo diminuir a adesão dos pacientes. Contudo, é possível superar este problema com algumas opções: dentre elas, uma é variar a natureza do centro metálico destes compostos, por exemplo, compostos baseados em rutênio.

Os compostos de rutênio chamaram atenção no momento de suas descobertas, pois agem em tumores locais ou somente em situações de metástase, apresentando mecanismos de ação diferentes e bastante dependentes do meio biológico de atividade. Acredita-se que compostos de Ru(III) são pró-drogas, ou seja, são ativados por sua redução a Ru(II), que é mais reativo *in vivo* devido ao meio ácido de hipóxia criados pelo rápido crescimento de células pouco vascularizadas no tecido do tumor (Medici, 2015). E, de fato, o composto NAMI-A (Figura 1.9) chegou à fase II de teste clínicos em portadores de tumores de várias identidades, mas efeitos colaterais adversos e a pouca eficácia levaram pesquisadores a suspender os testes experimentais (Leijen, 2015). Hoje, o complexo de rutênio NKP1339 (Figura 1.9) é o único metalofármaco à base de rutênio em ensaios clínicos na fase I contra câncer de pâncreas, colorretal ou gástrico (Trondl, 2014).

FIGURA 1.9. Estruturas dos complexos de Rutênio (III) e de Rutênio (II).

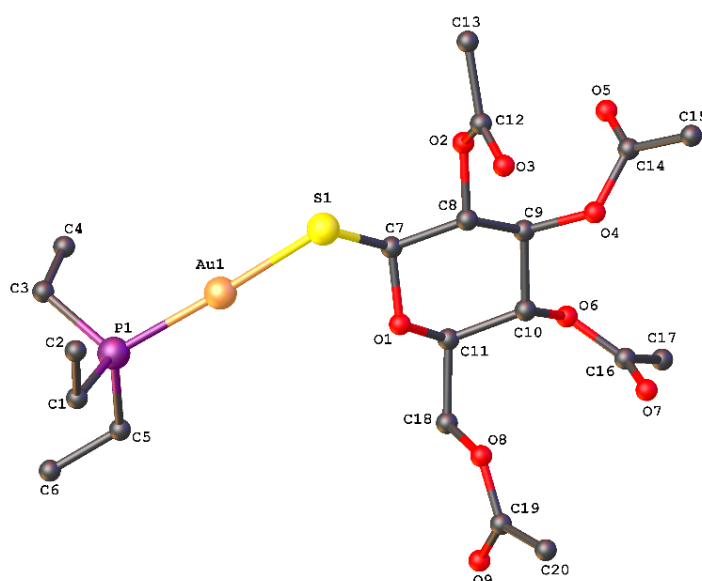


Existem alguns íons de metais de transição que também podem assumir o papel de protagonista em novos metalofármacos: o Au(III), isoeletrônico ($[Xe] 5d^8$) e isoestrutural (geometria quadrado planar) ao íon de Pt(II) é uma das escolhas mais procuradas por pesquisadores. Porém, íons como o Au(I), que não tem uma configuração eletrônica ou geometria semelhante, também são de interesse na corrida para descobrir uma alternativa à platina(II). A família de agentes biologicamente ativos baseados nos íons de ouro apresenta efeitos antiproliferativos expressivos tendo como alvo de ação diferentes estruturas-chave do metabolismo celular, como as mitocôndrias ou a inibição de algumas enzimas importantes expressadas em maior volume no decorrer de algumas doenças, interações com redutores endógenos como a glutathione

(Anthony, 2020), interferindo na regulação de espécies reativas de oxigênio e até coordenando-se com resíduos de aminoácidos que contêm grupos tiol em diversas proteínas (Gabbiani, 2007).

Um exemplo de sucesso dos compostos de ouro(I) é a auranofina (Figura 1.10), um medicamento aprovado inicialmente para o tratamento de artrite reumatoide, que vem sendo testado em outros tipos de doenças (Roder, 2015). Sobre sua atividade antiviral, foi reconhecido que a auranofina previne a infecção das células pelo SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19, responsável pela pandemia que impactou o mundo desde 2019 (Laplantine, 2022). Outros estudos envolveram o uso da auranofina no âmbito do reposicionamento de fármacos em ensaios clínicos para o tratamento de câncer, mas não prosseguiram pelo desconhecimento de seu mecanismo de ação, até que Tian e colaboradores sugeriram a inibição de uma importante enzima que participa da via do mevalonato no metabolismo celular como seu alvo terapêutico (Tian, 2019).

FIGURA 1.10. Estrutura da auranofina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para clareza.

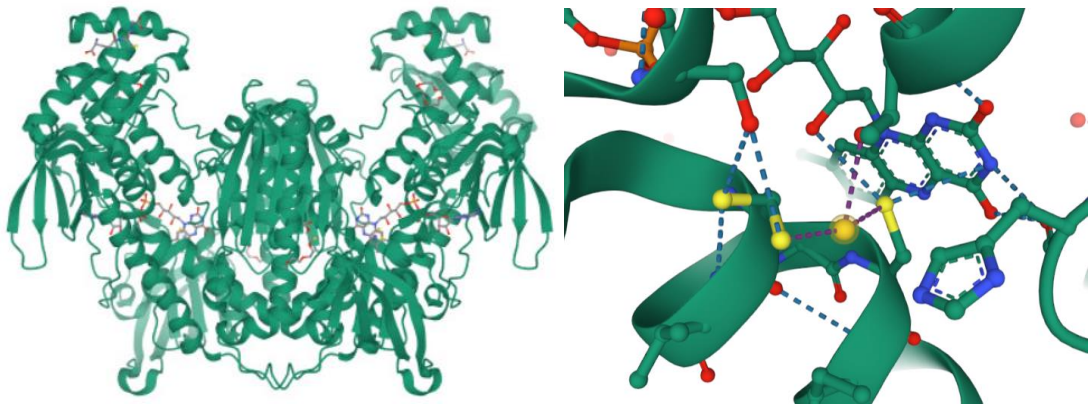


Fonte: Adaptado de D.T. Hill, 1980 (Hill, 1980). Dados cristalográficos disponíveis em CCDC: 1101703.

Este medicamento também se mostrou potente contra doenças negligenciadas, principalmente a esquistossomose. Angelucci e colaboradores demonstraram a inibição da enzima tioredoxina-glutationa redutase (TGR), envolvida em uma das etapas de neutralização de espécies reativas de oxigênio no parasita *Schistosoma mansoni* (Angelucci, 2009). Neste caso, o complexo é uma pró-droga: em linhas gerais, o metalofármaco é ativado dentro do organismo pela troca dos seus ligantes originais. O estudo mostra a estrutura da enzima após a ativação da auranofina, quando o íon de Au(I) troca seus ligantes originais do fármaco pelos resíduos de

cisteína em três posições diferentes na biomolécula, tornando-se um inibidor não competitivo gerando estresse oxidativo do parasita e conseqüentemente a sua morte (Angelucci, 2009) (Figura 1.11).

FIGURA 1.11. Aduto da TGR com o produto da auranofina (à esquerda) e o Au^I coordenado a resíduos de cisteína da enzima em um dos três sítios de interação, inibindo a atividade enzimática (à direita).

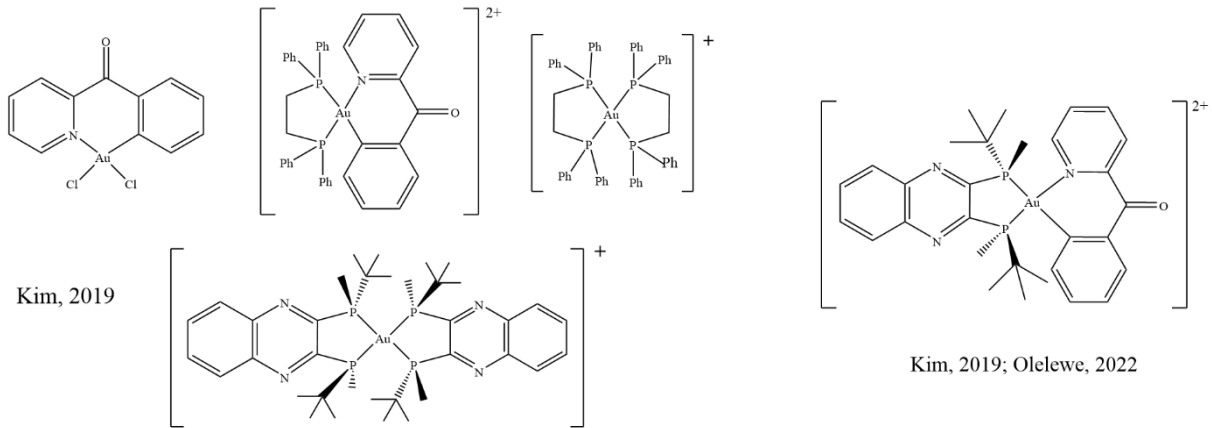


Fonte: Código PDB: 3H4K.

Nenhum complexo de ouro(III) chegou a ser testado em humanos, mas sua atividade *in vitro* e *in vivo* em modelos de camundongos é bem descrita pela literatura.. Diferentemente dos complexos de Pt(II), os de Au(III) possuem diferentes alvos terapêuticos como a enzima tioredoxina redutase e outras proteínas que carregam resíduos ricos em tióis ou selênio. Isso é importante, pois apesar do seu alto número de oxidação, este íon de ouro ainda é considerado macio segundo a teoria de ácidos e bases de Pearson, tornando-se um ótimo eletrófilo para ser atacado por tais grupos baseados em S ou Se (Lu, 2022). Kim e colaboradores sintetizaram complexos de ouro(III) organometálicos com ligantes fosfinas (Figura 1.12). Contra diversas linhas tumorais, os complexos apresentaram valores de IC₅₀ em concentração micromolar, exibindo uma potente citotoxicidade ligada à apoptose via ROS. Os mecanismos de ação, mais uma vez, foram diferentes daqueles observados para a cisplatina, por exemplo: despolarização da mitocôndria ou truncamento do ciclo celular em uma das suas fases de multiplicação (Kim, 2019). Como complementação, Olelewe e colaboradores levaram mais a fundo o estudo de um destes complexos (Figura 1.12) e foi observado que a sua atividade citotóxica contra câncer de mama triplamente negativo (uma linha bastante agressiva e de pouca perspectiva de cura) em modelos vivos de camundongo se baseia na perturbação da função mitocondrial numa combinação de despolarização da membrana, acumulação de ROS na organela e interação com o DNA mitocondrial. O interessante é que os efeitos foram verificados com IC₅₀ na casa de 220-650

nM, traçando um ótimo caminho para que o composto seja levado aos testes clínicos em humanos (Olelewe, 2022).

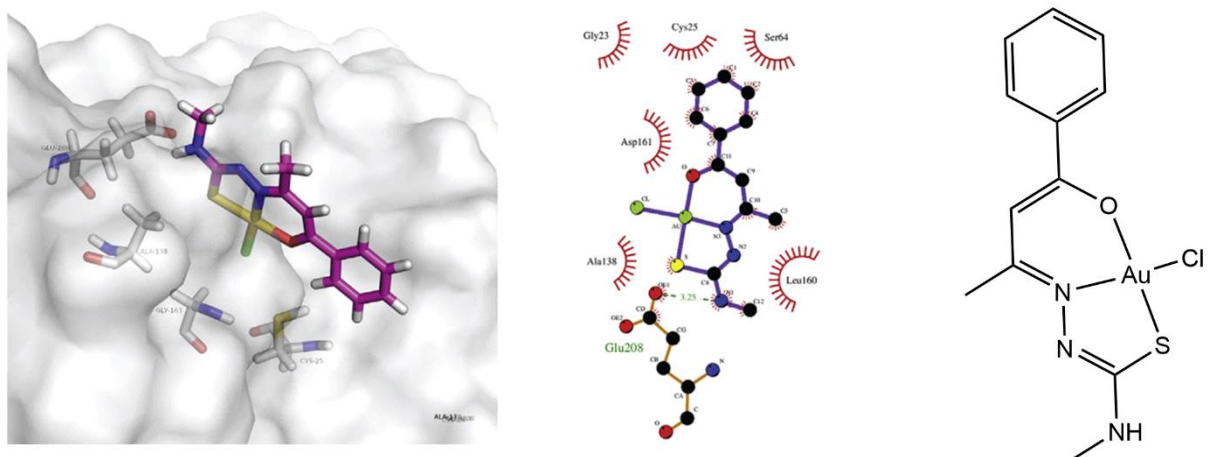
FIGURA 1.12. Alguns dos complexos de ouro(III) explorados por Kim, Olelewe e colaboradores.



Fonte: Kim, 2019; Olelewe, 2022.

Tratando-se de compostos de coordenação de ouro(III) com ligantes tiossemicarbazonas, há destaque para dois trabalhos realizados dentro do Brasil. Primeiramente o estudo realizado por Rettondin e colaboradores, onde realizaram a síntese do ligante e seu respectivo complexo e investigaram sua atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Foi atestado que tanto na forma tripomastigota e amastigota do parasita o complexo apresentou uma potente atividade, sem aumentar a citotoxicidade à célula hospedeira, indicando certa seletividade. Também foram feitos estudos teóricos de *molecular docking* onde o composto possui alta interação com a proteína cruzaina (Rettondin, 2016) (Figura 1.13).

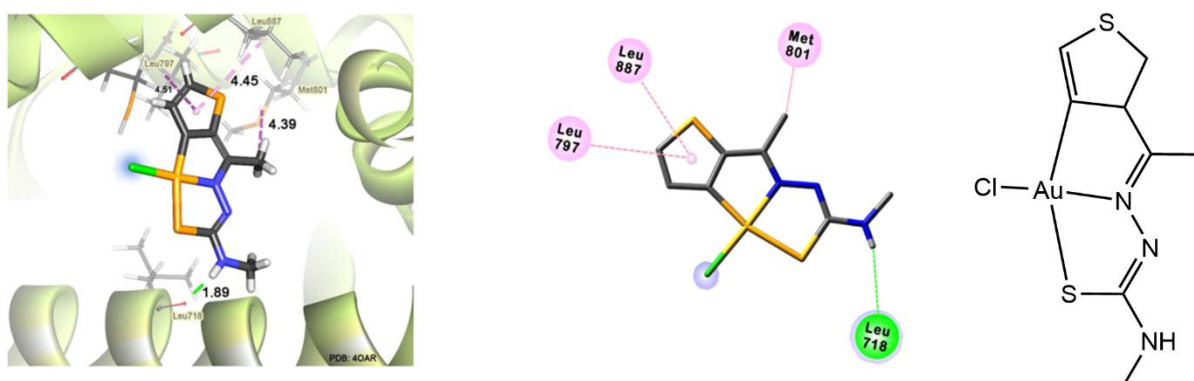
FIGURA 1.13. À esquerda, os modos de interação intermoleculares preditos para o composto estudado como potencial inibidor da cruzaina. À direita, uma representação do complexo de ouro(III) sintetizado pelos autores.



Fonte: Rettondin, 2016.

Já Almeida e colaboradores sintetizaram complexos de platina(II) e ouro(III), também com tiossemicarbazonas, e investigaram sua atividade biológica contra a linha de câncer de mama MCF-7. Todos os compostos alteraram a viabilidade das células, mas o composto que mais causou a apoptose foi o complexo de ouro(III), dado corroborado pelos testes teóricos de *docking* onde este composto teve a maior interação com os resíduos da proteína receptora de progesterona (PR), de alta expressão em tumores de mama (Almeida, 2022) (Figura 1.14).

FIGURA 1.14. À esquerda, os modos de interação intermoleculares preditos para o composto estudado frente à PR. À direita, uma representação do complexo de ouro(III) organometálico sintetizado pelos autores.



Fonte: Almeida, 2022.

A literatura é clara ao mostrar a importância das bases de Schiff como agentes de potencial farmacológico, assim como é a importância que carregam, cada vez mais, os metalofármacos na intensa luta da pesquisa contra o câncer. Os estudos mostram que os complexos de metais de transição, com enfoque especial para o ouro, com ligantes tiossemicarbazonas podem ser um dos caminhos explorados para a obtenção de novas moléculas capazes de entregar um tratamento eficiente e alternativo aos empregados atualmente, visando a melhoria e qualidade de vida dos pacientes portadores de câncer.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a síntese e a caracterização estrutural de novos compostos da classe das tiossemicarbazonas e seus respectivos complexos de ouro, além de avaliar a sua possível atividade antiproliferativa em ensaios de viabilidade celular contra distintos tipos de células tumorais. Dessa forma, tem-se como objetivos específicos:

- I. A síntese de tiossemicarbazonas variando seus grupos terminais, com o intuito de avaliar se as mudanças estruturais refletem em diferentes resultados de atividade citotóxica;
- II. A síntese dos respectivos complexos de ouro partindo dos novos ligantes obtidos;
- III. A caracterização das moléculas por meio de técnicas espectroscópicas e físico-químicas com a intenção de confirmar as suas estruturas moleculares;
- IV. Avaliar a atividade biológica das novas tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro contra as linhagens HeLa (câncer de colo do útero) e HepG2 (câncer de fígado).

3. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Reagentes e Solventes

Tabela 3.1. Lista de reagentes e solventes

Reagentes e Solventes	Fonte	Grau de Pureza
2,2'-bipiridina	Vetec	99,5 %
4-benzil-3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich	-
4-metil-3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich	97 %
Acetonitrila	Sigma-Aldrich	P.A.
Cloreto de ouro(III) trihidratado	Sigma-Aldrich	99%
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich/Vetec	P.A.
Dimetilsulfóxido-d6 (DMSO-d6)	Sigma-Aldrich	-
Etanol	Synth	P.A.
Glutaraldeído (1,5-pentanodial)	Sigma-Aldrich	25 % (v/v)
Piridina	Vetec	P.A.

3.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho

A técnica de FTIR investiga as energias de vibração das ligações químicas de um composto e de forma qualitativa indica a ausência ou presença de grupos funcionais das moléculas. O equipamento Frontier FT-IR utilizado pertence à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com análises feitas por ATR (Reflexão Total Atenuada).

3.1.3. Análise Elementar

Os compostos purificados serão estudados por análise elementar (% C, H, N), utilizando o equipamento Perkin Elmer 2400 series II pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.1.4. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível

Os espectros obtidos da análise de Uv-Vis de compostos mostram as transições eletrônicas e os comprimentos de onda de radiação absorvidos pelos compostos. Os experimentos foram feitos em microplacas de quartzo e acompanhados no equipamento SpectraMax M4

(Molecular Devices), do Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos (LAQBAM-IQUSP) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.1.5. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

O RMN de ^1H e ^{13}C se mostra como uma poderosa técnica de compreensão da estrutura molecular dos compostos. Os espectros obtidos podem indicar a formação de complexos metálicos pela mudança dos picos de deslocamento químico observados inicialmente nos ligantes livres. O equipamento utilizado para realizar as análises foi o INOVA de 7T (300 MHz) e o Bruker Avance III de 11,54T (500 MHz) pertence à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e todas as análises feitas utilizaram o solvente DMSO- d_6 .

3.1.6. Temperatura de Fusão

Os compostos obtidos tiveram suas temperaturas de fusão aferidos. O aparelho usado, o MQAPF – 302, pertence ao Laboratório Didático de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.1.7. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas ESI-MS foram obtidos no modo positivo utilizando o equipamento MicroTof Bruker Daltonics pertencente a Central Analítica do IQUSP. Os valores da voltagem e temperatura da fonte foram de 4500 V e 180 °C, respectivamente. Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO.

3.1.8. Método das Variações Contínuas (Job's Plot)

Examinando o espectro de uma série de soluções de frações molares variáveis de A até B (neste caso de metal até ligante), mas com o mesmo número total de mol de A + B, a estequiometria destes pode ser determinada. A absorbância em um determinado comprimento de onda de maior mudança é plotado contra o valor de fração molar de A e B; este geralmente é usado como a abscissa. Os gráficos têm pelo menos um ponto máximo ou mínimo e na maioria dos casos, este extremo ocorre em uma fração molar correspondente a estequiometria dos complexos que são formados em solução (Drago, 1992).

3.1.9. Análise Biológica

3.1.9.1. Cultura de células

As células das linhagens HeLa (câncer de cérvix humano) e HepG2 (câncer de fígado humano) foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina/antimicótico, a 37°C e 5% de CO₂, em uma incubadora. Quando atingiam 80% da confluência da garrafa, as células eram repicadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% por 5 minutos a 37°C. Após esse período, a suspensão de células era centrifugada, ressuspendida, e o número de células contado em camarada de Neubauer. Uma solução com número de células definido era preparada e adicionada em microplaca de 96 poços para o ensaio de viabilidade celular.

3.1.9.2. Ensaio de viabilidade celular (ensaio MTS)

O método colorimétrico MTS foi utilizado para realizar os ensaios de viabilidade celular com células das linhagens HeLa (câncer de colo do útero) e HepG2 (câncer de fígado) com o objetivo de avaliar o efeito da citotoxicidade dos compostos H₂L¹ e H₂L². Tanto as células HeLa, quanto as HepG2 foram adicionadas em microplaca de 96 poços e o tratamento foi adicionado. Este consistiu na adição dos compostos solubilizados em DMSO, com a concentração deste não excedendo 0,5% (v/v) e as concentrações dos compostos foram de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 e 10 µM e os testes realizados em duplicata. Os controles utilizados foram o próprio meio de cultura (negativo), meio de cultura com DMSO (positivo) e a droga antitumoral taxol (positivo). As células viáveis foram quantificadas após 24h de exposição ao tratamento. Decorrido este tempo, as soluções foram removidas e o MTS adicionado, a placa foi incubada por 2h a 37° C em seguida. Seu protocolo é baseado na redução do composto tetrazólio por redutases mitocondriais gerando o corante formazana, cuja absorbância foi medida em 490 nm e quantificada. O tratamento dos dados foi feito utilizando as médias dos valores de absorbância com seus respectivos desvios padrões (Riss, 2004).

3.1.10. Síntese dos adutos de DFO

A tentativa de síntese de adutos de DFO fez parte de hipóteses iniciais do projeto do mestrado, como é discutido na seção dos Resultados e Discussão.

3.1.10.1. Primeira rota para a síntese de DFO-GTA-mTSZ

O mesilato de desferrioxamina (90 mg, 0,137 mmol) foi dissolvido em 10 mL de etanol absoluto em um balão de fundo redondo de 100 mL, sob agitação magnética e refluxo em aproximadamente 70 °C e também utilizando o equipamento Huber Minichiller 300-H para resfriar o condensador do refluxo em 15° C com o intuito de diminuir o desperdício de água, uma vez que ele recicla todo o líquido utilizado. Para disponibilizar a amina terminal da molécula de DFO, é necessário desprotoná-la, ajustando o pH da solução a 9, de acordo com as constantes de protonação observadas por Bellotti e colaboradores (Bellotti, 2021). Isso foi feito adicionando oito gotas de trietilamina com uma pipeta pasteur de vidro e deixando reagir por cerca de 30 minutos. Em seguida foi adicionado 95,65 µL de glutaraldeído (0,14 mmol), a solução imediatamente mudou para uma coloração vermelha e nas próximas 1 hora e 20 minutos de reação a cor mudou para verde. A reação foi interrompida, pois a mudança de coloração não condiz com nenhum dos cromóforos presentes na molécula.

3.1.10.2. Segunda rota para a síntese de DFO-GTA-mTSZ

A solução reagente do glutaraldeído, originalmente, tinha rotulado em seu frasco de 1 L a concentração de 25% (v/v). Porém, como se tratava de um reagente mais antigo, eram necessários testes prévios para se atestar a verdadeira concentração. A mTSZ (312,3 mg, 2,97 mmol) foi pesada e transferida para um balão de fundo redondo de 100 mL. Foram adicionados 20 mL de etanol absoluto e sob agitação magnética e refluxo a uma temperatura de 70 °C por 10 minutos, o reagente foi solubilizado também utilizando o minichiller para resfriar a água do condensador a 15 °C. À última solução foram adicionados 283 µL de glutaraldeído (2,97 mmol) por 3 horas sob as mesmas condições de agitação e refluxo, indicando o que seria uma proporção de 1:1 de acordo com a concentração original. O aquecimento foi desligado para a solução atingir a temperatura ambiente. A cor final foi de um amarelo pálido. A solução-mãe foi transferida para um béquer para evaporação do solvente e cristalização do produto durante quinze dias. Sólidos cristalinos de cor amarela foram obtidos e secos em dessecador para se iniciarem as análises.

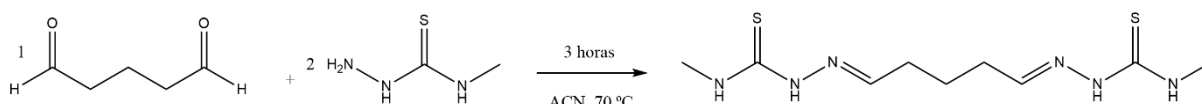
3.2. Sínteses das Tiossemicarbazonas

A síntese das tiossemicarbazonas deste trabalho foi desenvolvida em laboratório e discutida nas seções 4.1 e 4.2 dos Resultados e Discussão.

3.2.1. Síntese do composto pentano-1,5-diilidenobis(*N*-metilhidrazina-1-carbotioamida) [H₂L¹]

A síntese do agente complexante H₂L¹ (Figura 3.1) foi realizada dissolvendo em um balão de fundo redondo 315,48 mg (3 mmol) do reagente 4-metil-3-tiossemicarbazida em 10 mL de acetonitrila, sob agitação magnética em um sistema envolvendo refluxo e aquecimento a 70 °C. O reagente glutaraldeído é uma solução aquosa de concentração 25% (v/v), logo, foram adicionados 566 μL (1,5 mmol) avolumados em 5 mL de acetonitrila à primeira solução, sob as mesmas condições reacionais durante 4 horas, obtendo ao final da reação um líquido límpido e incolor, sem a presença de precipitado. A solução-mãe foi transferida para um béquer com o intuito de cristalizar o produto e após 14 dias houve a formação de um sólido branco. Rendimento: 70,8 % (291,4 mg). Temperatura de fusão: 163-165 °C.

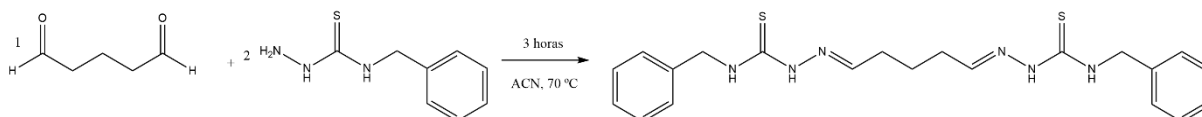
FIGURA 3.1. Esquema da síntese do ligante H₂L¹.



3.2.2. Síntese do composto pentano-1,5-diilidenobis(*N*-benzilhidrazina-1-carbotioamida) [H₂L²]

A síntese do agente complexante H₂L² (Figura 3.2) é similar à síntese de H₂L¹, onde dissolveu-se em um balão de fundo redondo 181,26 mg (1 mmol) do reagente 4-benzil-3-tiossemicarbazida em 10 mL de acetonitrila, também sob agitação magnética em um sistema de refluxo com aquecimento de 70 °C. Após a total solubilização, adicionou-se 188,8 μL (0,5 mmol) do reagente glutaraldeído, sob as mesmas condições reacionais durante 4 horas, obtendo ao final um líquido límpido e levemente amarelado, sem a presença de precipitado. A solução-mãe foi transferida para um béquer para a evaporação do solvente. Após 9 dias, todo o solvente havia evaporado e uma espécie de óleo solidificado restava no fundo do recipiente. Rendimento: 62,6% (133,6 mg). Ponto de fusão: 48-52 °C.

FIGURA 3.2. Esquema da síntese do ligante H₂L².



3.3. Sínteses dos Complexos

Os procedimentos de síntese de todos os complexos propostos neste trabalho são melhor detalhados e discutidos na seção 4.4 dos Resultados e Discussão.

3.3.1. Transformação do reagente inicial de ouro(III) do ácido $\text{H}[\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ para o sal $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$

A síntese deste sal de ouro(III) foi baseada em sínteses já descritas na literatura, com algumas adaptações (Cinellu, 2000; Casini, 2010; Adams, 1982). Em um béquer, foram dissolvidas 1,0019 g (2,54 mmol) de $\text{H}[\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 20 mL de etanol absoluto sob agitação magnética e aquecimento em 65 °C. Após a total solubilização deste ácido, foram adicionadas, gota a gota, 0,41 mL (5,08 mmol) de piridina, ocasionando instantaneamente a precipitação de um produto amarelo intenso, O $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$. O béquer então foi colocado em um banho de gelo para estimular maior precipitação e em seguida filtrado. Após completamente secos, foram pesados. Rendimento: 83,9% (892,7 mg).

3.3.2. Síntese do sal $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$

Esta síntese seguiu o protocolo detalhado por Casini e colaboradores (Casini, 2010). Em um balão de fundo redondo, sob refluxo e agitação magnética, foram dissolvidos 31,2 mg (0,2 mmol) de 2,2'-bipiridina em 0,5 mL de acetonitrila. Foram adicionadas 83,5 mg (0,2 mmol) de $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$ dissolvidos em 5 mL de acetonitrila, seguidos de 110,43 mg (0,6 mmol) de KPF_6 sólido. A suspensão de coloração amarela foi deixada reagir, sob as mesmas condições, durante 19 horas e então deixada para atingir a temperatura ambiente. Utilizou-se o rotaevaporador para obter o sólido que foi lavado com quatro alíquotas de 5 mL de água deionizada gelada. O produto foi seco sobre sílica durante um dia, obtendo-se o produto de cor amarela $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$. Rendimento: 91,8% (104,3 mg). ^1H RMN (298,15 K, 500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9,41$ (d, 2 H), 8,94 (d, 2 H), 8,73 (td, 2 H), 8,14 (td, 2 H) (Figura 4.25). ESI-MS (dissolvida em DMSO e diluída em acetonitrila, modo de aquisição positivo): $m/z = 422,97$ $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]^+$. Os respectivos espectros encontram-se no Apêndice II.

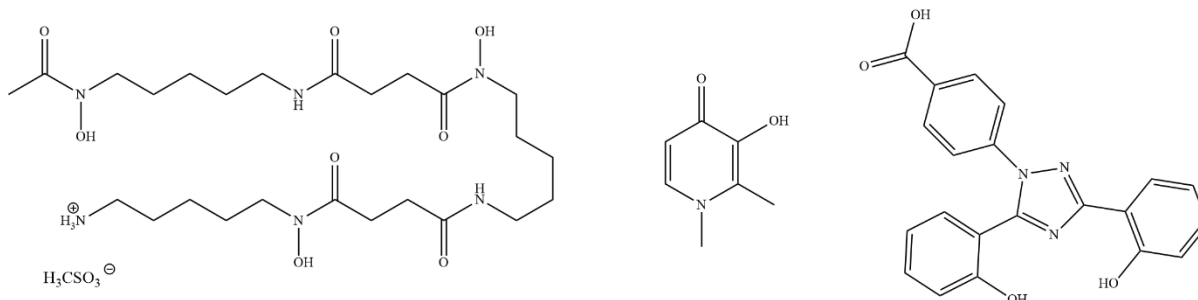
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de situar o leitor de todos os resultados e processos que levaram a obtenção dos novos compostos que serão discutidos, e em prol da transparência, será descrito a seguir todo o caminho trilhado durante os 18 meses de pesquisa desenvolvida no mestrado. Afinal, a pesquisa científica é complexa e passível de alteração dos seus planos iniciais, todos fundamentados nos resultados obtidos, e que esta dissertação também sirva como documento de resultados experimentais que, utilizando-se da metodologia empregada, mostraram-se infrutíferos.

A hipótese inicial do projeto de pesquisa envolvia a síntese e caracterização de complexos de ouro(III) com ligantes que são, hoje, medicamentos empregados no tratamento de doenças causadas pela sobrecarga de ferro no organismo humano. Os três quelantes de ferro planejados eram o mesilato de desferrioxamina, a deferiprona e o deferasirox (Figura 4.1).

FIGURA 4.1. Estruturas moleculares dos quelantes de ferro aprovados para uso clínico no tratamento de doenças de sobrecarga de ferro e pensados como ligantes para a síntese de complexos de ouro. Em sequência: mesilato de desferrioxamina, deferiprona e deferasirox.

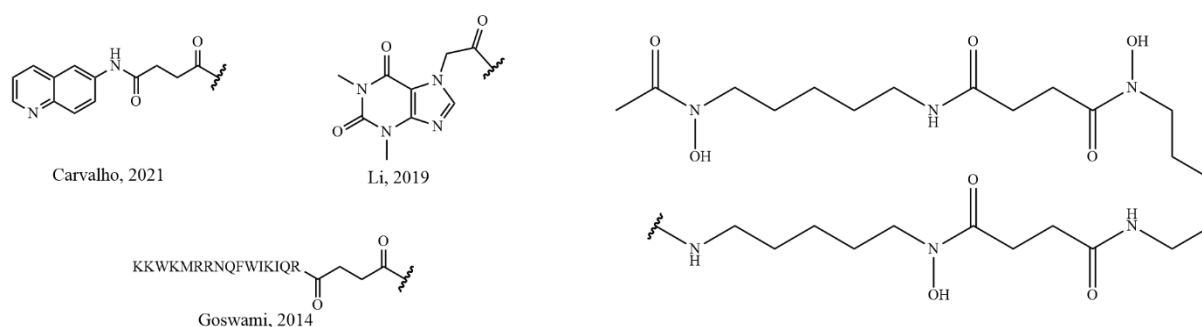


Diversas condições reacionais foram empregadas para tentar viabilizar a síntese dos complexos, porém não foram possíveis por algumas razões. Em primeiro lugar, o ouro(III) possui um potencial de redução alto ($\text{Au}^{3+} + 2e^- \rightleftharpoons \text{Au}^+$, $E^\circ = +1,36 \text{ V}$; $\text{Au}^{3+} + 3e^- \rightleftharpoons \text{Au}^0$, $E^\circ = +1,52 \text{ V}$ (Bard, 1985; Milazzo, 1978; Swift, 1972); sendo um oxidante forte, os ligantes referenciados são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e estas características levavam a redução do sal de ouro utilizado no início das sínteses. Além disso, todos os agentes complexantes utilizam de átomos de oxigênio para se coordenarem aos centros metálicos, e estes são considerados bases duras na teoria de ácidos e bases de Pearson, enquanto ambas as identidades iônicas do ouro são consideradas ácidos macios, o ouro(III) e muito mais o ouro(I). Há uma incompatibilidade na própria química de coordenação dos compostos planejados. Claro, há exemplos em que átomos de oxigênio encontram-se coordenados aos cátion de ouro(III), inclusive

referenciados neste trabalho, porém sempre ocupam um terceiro ou quarto sítio de coordenação restante dentre os outros que estão ocupados por átomos mais macios.

Afim de continuar utilizando os quelantes, uma das propostas foi utilizar a amina final encontrada na DFO como o primeiro elo da corrente de uma âncora. Existem diversos trabalhos, inclusive desenvolvidos no próprio laboratório (Carvalho, 2021; Li, 2019; Goswami, 2014) (Figura 4.2), da formação de adutos entre alguma molécula e a desferrioxamina (via amina sua amina terminal) com algum *linker* orgânico fazendo a ligação entre as duas partes.

FIGURA 4.2. Representações moleculares dos conjugados de desferrioxamina com aminas aromáticas, cafeína e peptídeos.

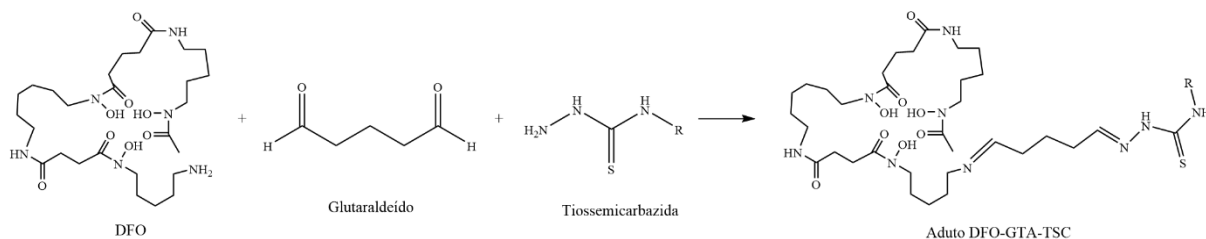


Fonte: Adaptados de Goswami, 2014; Li, 2019; Carvalho, 2021.

As rotas mais comuns da síntese de adutos da desferrioxamina com outras moléculas são via oxidação da amina terminal da DFO em uma amida. Porém, há uma rota alternativa que não envolve a formação de ligações peptídicas. Esta utiliza a molécula do glutaraldeído (1,5-pentanodial; GTA) como o *linker*. Essa rota sintética é bastante utilizada no chamado cross-linking proteico, onde as carbonilas do dialdeído podem sofrer reações do tipo adição de Michael ou formam bases de Schiff com os resíduos de aminoácidos. Migneault e colaboradores exemplificaram as várias relações de acidez e os aminoácidos envolvidos nessas reações (Migneault, 2004). Uma outra aplicação da molécula do glutaraldeído como *linker* foi explorada em um estudo de Zhang e colaboradores, onde foi feita a síntese de um polímero do aldeído com tiossemicarbazidas suportados em nanopartículas de sílica, com o intuito de remover seletivamente íons de ouro(III) de soluções aquosas (Zhang, 2017).

Uma proposta logo amadureceu e a ideia de formar um aduto entre a DFO e uma tiossemicarbazida, via glutaraldeído como *linker* orgânico, tornou-se interessante. A porção de uma tiossemicarbazona em um aduto com DFO seria importante, pois teoricamente seria o ponto de ancoragem de átomos de ouro, já que esta fração carrega átomos coordenantes mais macios. Um esboço teórico da formação do composto pretendido está descrito na Figura 4.3.

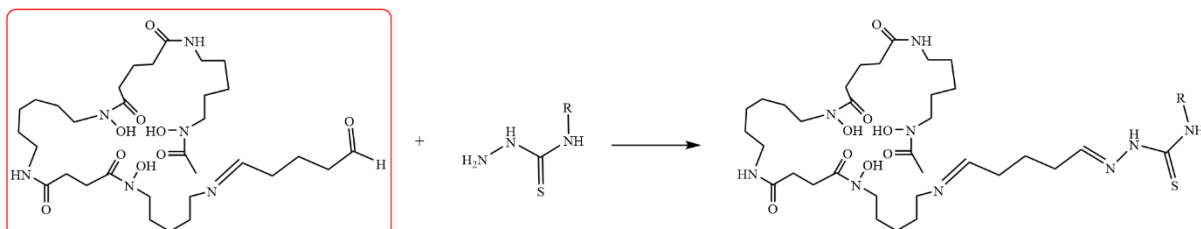
FIGURA 4.3. Esquema que representa os reagentes de partida e a molécula final que combina a DFO, glutaraldeído (GTA) e tiossemicabazida. (R = grupo metila ou benzila).



Foi necessário adaptar uma metodologia de síntese para essa nova molécula, visto que após uma extensa pesquisa bibliográfica não foi encontrado nenhum procedimento já estudado que envolvia qualquer combinação entre as três moléculas. Foram definidas duas rotas diferentes como ponto de partida da síntese: começando pela molécula de DFO e começando pela molécula de 4-metil-3-tiossemicabazida (mTSZ).

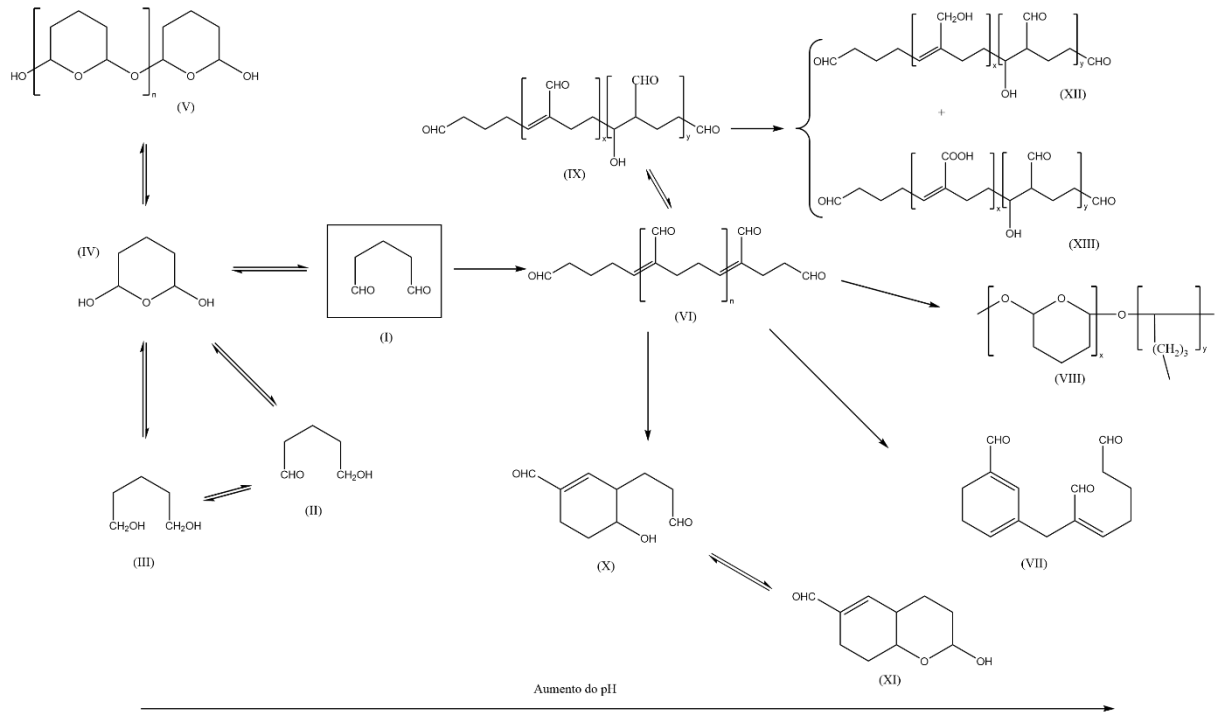
A primeira rota pensada para a síntese da molécula final de interesse (Figura 4.4) tinha o objetivo de sintetizar inicialmente a molécula DFO-GTA:

FIGURA 4.4. Esquema geral da síntese da molécula de interesse DFO-GTA-mTSZ, partindo da síntese do intermediário destacado em vermelho, o DFO-GTA.



Após investigar as possíveis limitações que a metodologia empregada poderia apresentar, uma se tornou bem clara: o comportamento da molécula do glutaraldeído é pH dependente. Como observado por Migneault e colaboradores, para soluções neutras ou alcalinas, o dialdeído passa por processos de polimerização e ciclização (Migneault, 2004). Como o pH da solução tem que ser ajustado em 9 para que ocorra a desprotonação da amina terminal do DFO, ao adicionar a solução de glutaraldeído em meio básico, há a sua rápida transformação em outras moléculas que possuem duplas conjugadas e heteroátomos (Figura 4.5), estruturas essas que condizem com a coloração observada durante a síntese. Esse fato fez com que esta primeira rota e tentativa de síntese fosse descartada.

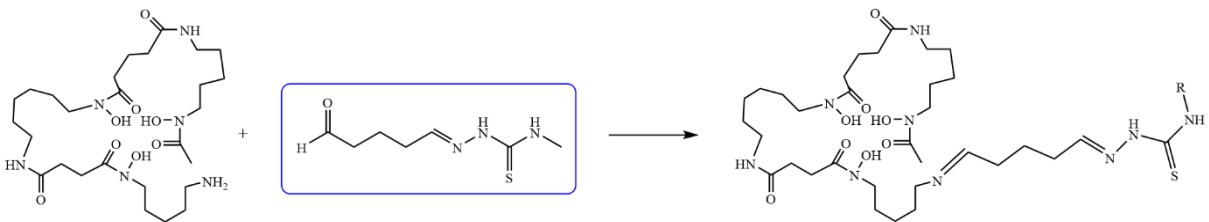
FIGURA 4.5. Comportamento do glutaraldeído em solução.



Fonte: Adaptado de Migneault, 2004.

A outra rota escolhida (Figura 4.6) foi partindo da molécula de 4-metil-3-tiossemicarbazida. O objetivo era sintetizar a molécula GTA-mTSZ e caracterizá-la para depois formar o aduto DFO + GTA-mTSZ.

FIGURA 4.6. Esquema geral da síntese da molécula de interesse DFO-GTA-mTSZ, partindo da síntese do intermediário destacado em azul, o GTA-mTSZ.



Os sólidos cristalinos de cor amarela foram submetidos, primeiramente, a uma análise elementar e temperatura de fusão. Os resultados obtidos (Tabela 4.1) renderam surpresas.

TABELA 4.1. Valores calculados e experimentais de análise elementar para a síntese inicial do GTA-mTSZ.

Teórico	Experimental	Temperatura de fusão
C: 44,9%	C: 38,35%	163 °C – 165 °C
H: 7,00%	H: 6,63%	

N: 22,44%

N: 29,26%

Claramente não se trata da molécula de interesse. Porém ao se analisar profundamente o que poderia ter ocorrido durante a síntese, com o fato do desconhecimento da concentração original do glutaraldeído em mente, a possibilidade de ter ocorrido uma condensação de ambas as carbonilas poderia ser a resposta para a grande diferença dos dados da análise de CHN. Uma representação desta molécula hipotética, o GTA-bis(mTSZ), está na Figura 4.7 e a comparação dos seus valores teóricos de CHN com os resultados obtidos da análise da Tabela 4.1 (anterior) são mostrados a seguir (Tabela 4.2).

FIGURA 4.7. Estrutura molecular do GTA-bis(mTSZ), resultante da dupla condensação das carbonilas do aldeído.

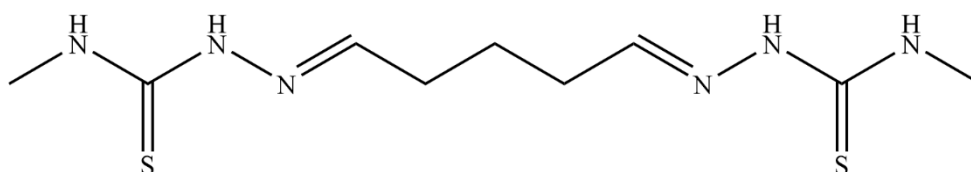


TABELA 4.2. Hipótese da formação do composto GTA-bis(mTSZ), utilizando o mesmo resultado da última análise de CHN, mas comparando com os novos valores teóricos.

Teórico	Experimental
C: 39,39%	C: 38,35%
H: 6,61%	H: 6,63%
N:30,63%	N: 29,26%

A comparação entre os resultados de análise elementar agora sugere que esta foi a molécula sintetizada pela metodologia empregada, que também indica que a concentração da solução de glutaraldeído era menor do que a original de 25% (v/v), mas era necessário refazer a reação e continuar as caracterizações para atestar a nova hipótese. Após uma ampla busca na literatura, não se encontrou nenhum registro da síntese, caracterização estrutural e aplicações da molécula de GTA-bis(mTSZ), nem de seus respectivos complexos metálicos. Decidiu-se então cessar a tentativa de síntese dos adutos de DFO e continuar com as caracterizações e explorar e desenvolver um estudo sobre esta nova molécula, seus complexos metálicos e seu perfil de bioatividade, dado que faz parte de um grupo de moléculas com interesse farmacológico, como discutido na Introdução. Para tanto, foi comprada uma nova solução de

glutaraldeído, para que o controle da concentração fosse confiável e novas tentativas de sintetizar o produto da dupla condensação da carbonila iniciaram.

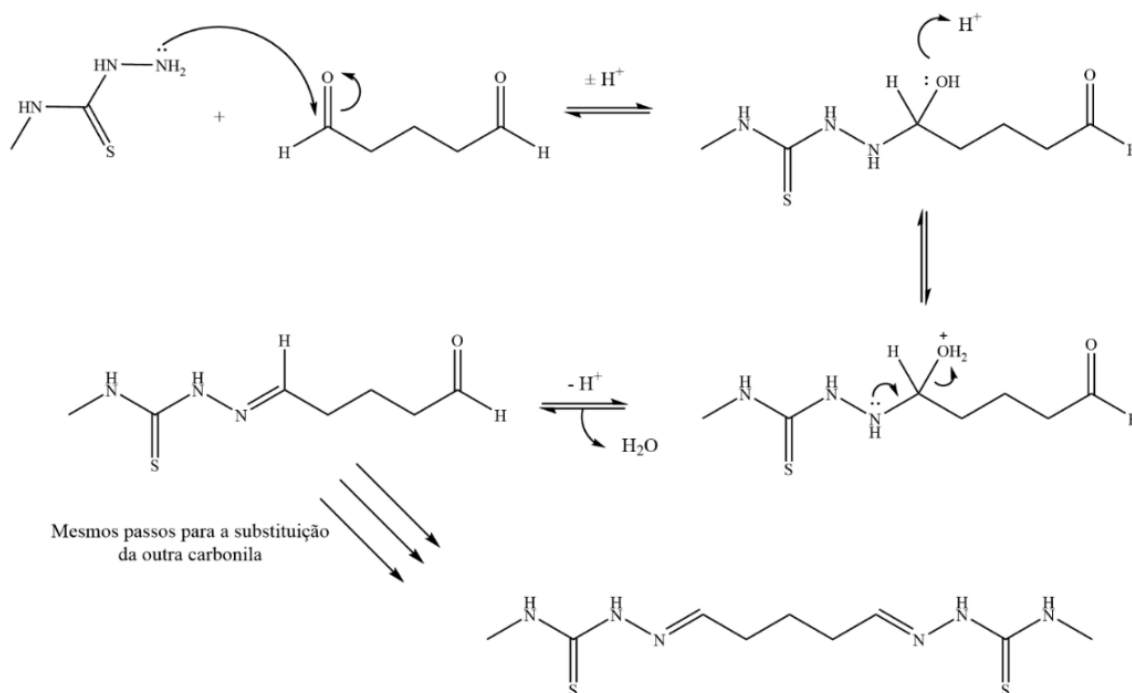
As primeiras tentativas da síntese do ligante GTA-bis(mTSZ) seguiram a metodologia comumente encontrada na literatura referenciada para a formação de tiossemicarbazonas. Elas partem da condensação da carbonila de cetonas com suas respectivas tiossemicarbazidas em meio etanólico. A única diferença para este trabalho seria a troca da carbonila de cetonas para a carbonila de aldeído do glutaraldeído, porém foram encontrados problemas. Eles residem majoritariamente no fato que essas carbonilas de aldeídos são mais reativas que as de cetonas e quando estão em um meio onde o álcool está em grande excesso (neste caso é o solvente) as porções C=O sofrem uma adição nucleofílica e formam hemiaminais e aminaís. Devido a este fato, a porção necessária para a condensação é perdida e a reação não pode prosseguir. Com isso em mente, foi escolhido um solvente alternativo, que fosse polar, aprótico e não interagisse com o aldeído desta mesma forma: a acetonitrila. A reprodutibilidade foi atingida desde a primeira síntese e foi consolidado o sucesso da formação da nova tiossemicarbazona duplamente substituída GTA-bis(mTSZ). Para fins práticos, a partir deste momento do texto a molécula será nomeada H₂L¹.

Foi possível a obtenção e caracterização completa de dois compostos inéditos. Diferentes técnicas espectroscópicas e físico-químicas como FTIR, UV-Vis, espectrometria de massas, RMN de hidrogênio e carbono, análise elementar e temperatura de fusão foram empregadas para elucidar a estrutura molecular destes novos compostos. Além disso também foram atestadas as suas atividades biológicas contra linhagens tumorais.

4.1. Caracterização da estrutura molecular de H_2L^1

A seguinte rota de mecanismo da formação de H_2L^1 a partir do glutaraldeído e a 4-metil-3-tiossemicarbazida é proposta (Figura 4.8):

FIGURA 4.8. Mecanismo de reação proposto para a síntese do ligante H_2L^1 .



O nitrogênio mais básico da porção da hidrazina da tiossemicarbazida ataca uma das carbonilas do glutaraldeído, formando a espécie hemiaminal em questão. A partir de uma transferência de prótons, o oxigênio proveniente da carbonila é protonado resultando na hidroxila, que por sua vez é protonada tornando-se um bom grupo de saída para o seguinte ataque do par de elétrons livres do mesmo nitrogênio mencionado anteriormente. Uma imina então é formada, dando origem à base de Schiff monosubstituída do glutaraldeído. Os mesmos passos reacionais são repetidos para a outra carbonila que resulta no produto final desejado, o H_2L^1 .

4.1.1. Rendimento, Temperatura de Fusão e Análise Elementar para H_2L^1

Como uma parte preliminar das caracterizações, os resultados das técnicas físico-químicas de análise, como a temperatura de fusão e análise elementar do composto sintetizado (Tabela 4.3) fornecem informações que dizem respeito à formação da molécula, uma vez que a mudança dessas variáveis em relação aos seus reagentes de partida representa um bom indicativa inicial de sucesso da síntese.

TABELA 4.3. Análise elementar, temperatura de fusão e rendimento do composto H₂L¹, assim como sua fórmula molecular e massa molar.

Análise Elementar			Temperatura de Fusão	Rendimento
Teórico	Experimental	Δ	163 °C – 165 °C	70,79% (294,4 mg)
C: 39,39%	C: 39,70%	C: 0,31%		
H: 6,61%	H: 6,58%	H: 0,03%		
N: 30,63	N: 30,19%	N: 0,44%		
Fórmula Molecular			Massa Molar	
C ₉ H ₁₈ N ₆ S ₂			274,40 g/mol	

4.1.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para H₂L¹

Uma análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada no composto. A Tabela 4.4 mostra os principais valores de número de onda obtidos do espectro para H₂L¹, assim como o respectivo espectro na Figura 4.9.

O espectro de infravermelho mostra com clareza as vibrações dos grupos funcionais mais característicos presentes na estrutura molecular proposta para o H₂L¹. Observa-se na região de 3174,42 cm⁻¹ os estiramentos referentes às ligações N-H e na região de 1553,25 cm⁻¹ o estiramento da ligação C=N conforme o esperado na literatura, já que não há nenhuma conjugação presente fazendo com que o sinal se desloque para um número de onda menor. Outra evidência são os sinais referentes ao estiramento da ligação C=S, observados nas regiões de 1036,98 e 785,20 cm⁻¹, segundo Wiles e colaboradores em um estudo que compila diversos dados experimentais e teóricos mostrando que esse estiramento pode acoplar com ligações adjacentes e por isso pode haver a formação de dois sinais referentes ao estiramento desta ligação no espectro de infravermelho (Wiles, 1967). É necessário também perceber que a falta de sinais no espectro de infravermelho também é indicativa da estrutura molecular do composto.

FIGURA 4.9. Espectro de infravermelho de H_2L^1 e o número de onda (cm^{-1}) dos modos vibracionais das ligações mais relevantes.

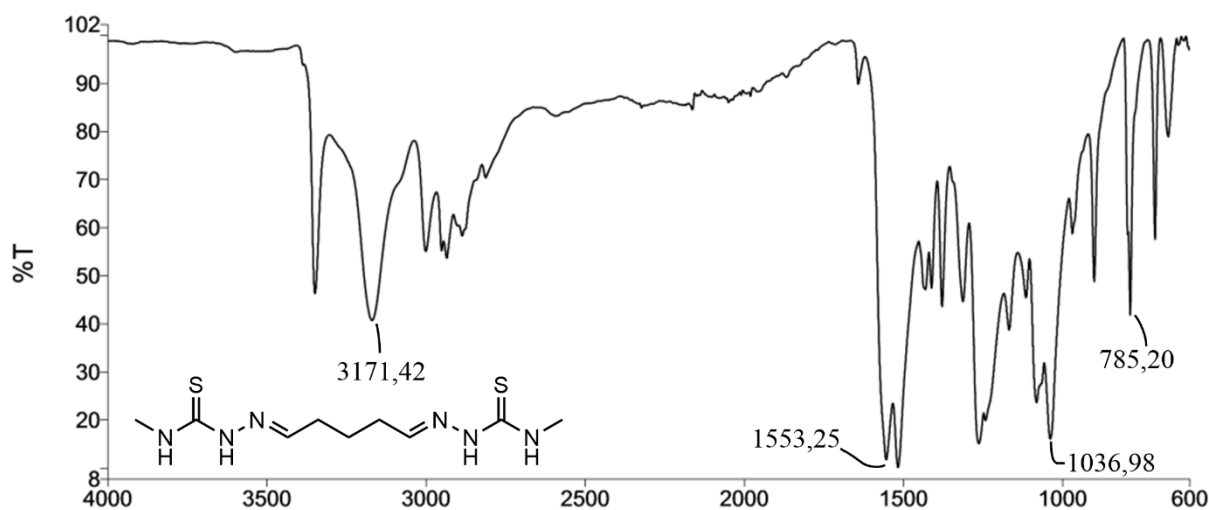


TABELA 4.4. Números de onda (cm^{-1}) dos modos vibracionais mais relevantes das ligações do composto H_2L^1 .

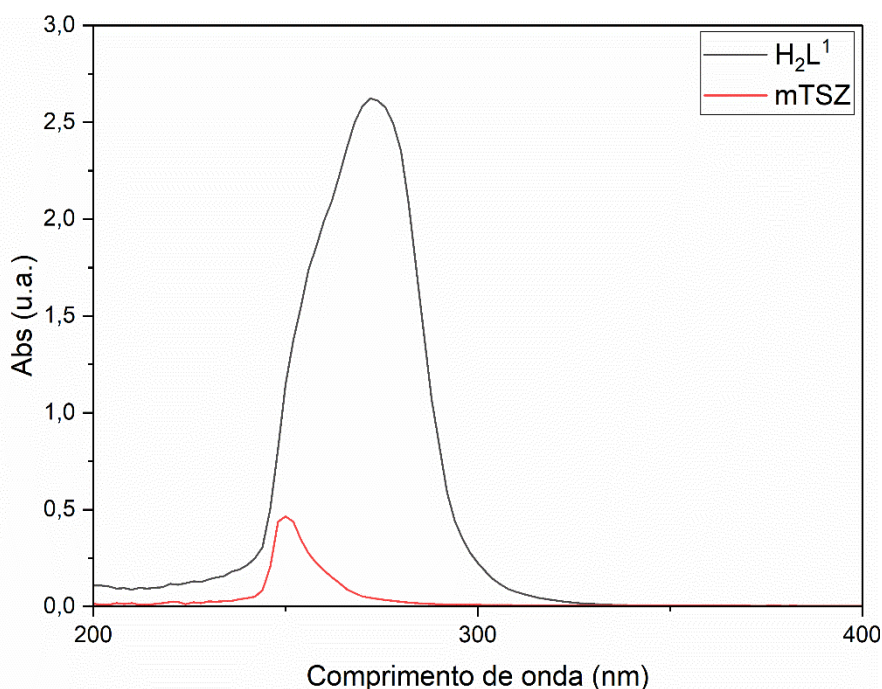
	$\nu(N-H)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C=S)$
H_2L^1	3174,42	1553,25	1036,98 e 785,20

A falta do pico referente ao estiramento da ligação $C=O$ de aldeído, na região entre $1740 - 1720\text{ cm}^{-1}$ indica que ambas as carbonilas foram efetivamente substituídas. O sinal duplo na região de $2800 - 2700\text{ cm}^{-1}$ característico do estiramento da ligação $C-H$ de aldeídos também é ausente no espectro, assim como o estiramento da ligação $S-H$ na região de 2550 cm^{-1} , indicando que o composto existe, no estado sólido, sob a forma do seu tautômero tiona, e não tiol.

4.1.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta para H_2L^1

A ferramenta de análise de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível também foi utilizada (Figura 4.10) para observar as possíveis transições eletrônicas e seus comprimentos de onda correspondentes que ocorrem na molécula de H_2L^1 e seu reagente de partida 4-metil-3-tiossemicarbazida. A absorção do glutaraldeído não aparece no gráfico, pois nesta concentração a intensidade da absorção é muito pequena, próxima de zero, impossibilitando a abstração de qualquer informação relevante. Foi utilizado como solvente o DMSO e as soluções foram feitas na concentração de $0,335 \cdot 10^{-3}\text{ mol/L}$.

FIGURA 4.10. Espectro de absorção UV-Vis da solução de H_2L^1 e 4-metil-3-tiossemicarbazida (mTSZ) em DMSO numa concentração $0,335 \cdot 10^{-3}$ mol/L.



Nota-se no espectro em vermelho o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção da molécula de 4-metil-3-tiossemicarbazida (mTSZ) de 250 nm, característico de suas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ localizado na região -NCS da molécula podendo ter algumas variações neste comprimento de onda de absorção de acordo com o grupo -R ligado ao átomo de nitrogênio, que neste caso é um grupo metila (Ronconi, 2005; Criado, 1992; Pavia, 2001). Em seguida temos a absorção de uma banda mais larga, em preto, referente à absorção da molécula de interesse, o H_2L^1 . Esta absorve em uma faixa maior de comprimentos de onda pelo fato de ser uma molécula maior que seus respectivos reagentes de partida, com novas conexões entre os átomos que acabam por rearranjar e criar novos níveis de energia dos novos orbitais moleculares. O $\lambda_{\text{máx}}$ ocorre em 272 nm, região essa que não possui absorção na mTSZ. Como há um rearranjo nos orbitais, este sinal provém da transição $n \rightarrow \pi^*$ dos pares de elétrons não-ligantes dos átomos de enxofre (Criado, 1992). É possível concluir da análise do espectro que, de fato, são apresentadas duas moléculas diferentes com perfis de interação com a radiação ultravioleta distintos. O espectro de absorção de H_2L^1 em outras concentrações se encontra no Apêndice IV.

4.1.4. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C para H_2L^1

As análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C também são ferramentas poderosas para a elucidação da estrutura molecular dos compostos químicos. Os dados observados no espectro de RMN de ^1H para o ligante H_2L^1 , representado na Figura 4.11 estão resumidos na Tabela 4.5, onde é possível perceber que tanto os valores das integrais como os padrões das multiplicidades estão, de modo geral, de acordo com o esperado para a estrutura proposta.

FIGURA 4.11. Espectro de RMN de ^1H de H_2L^1 (em DMSO-d_6 , 7T).

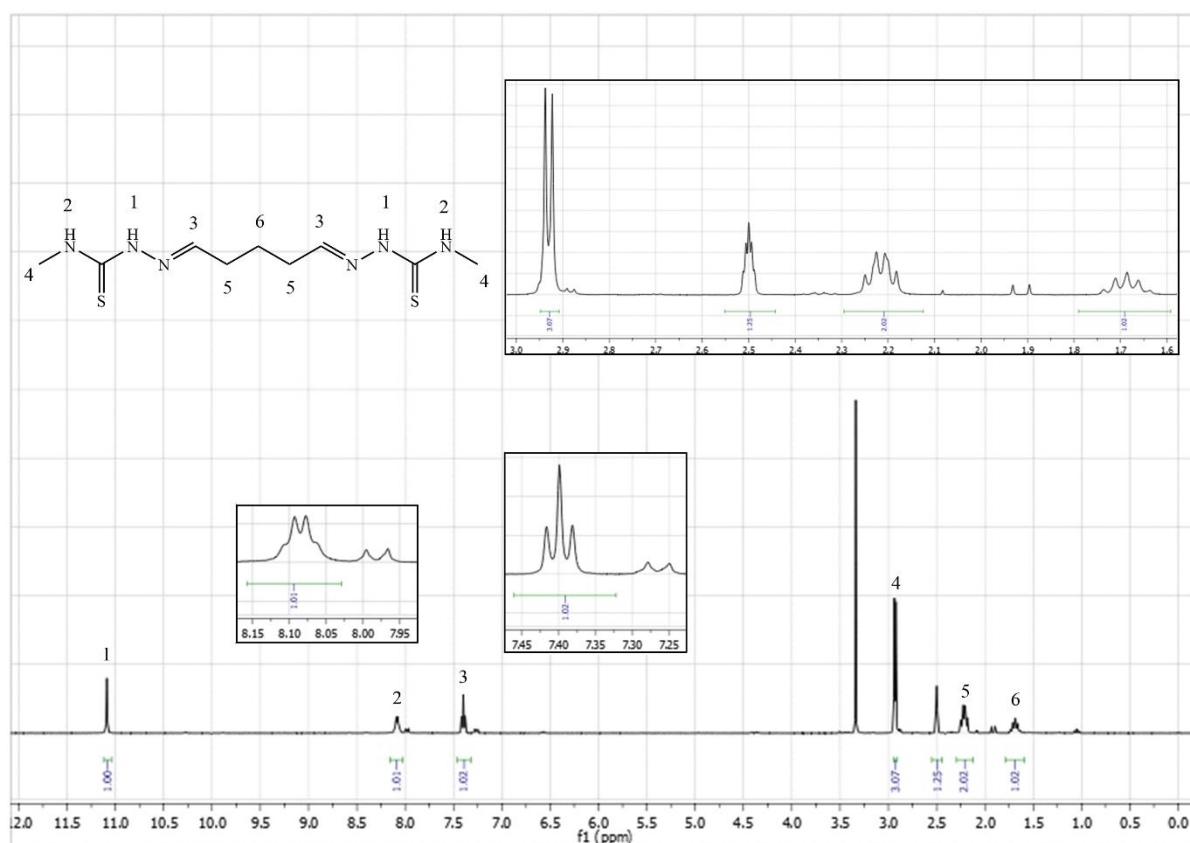


TABELA 4.5. Valores de deslocamento químico, integração, suas multiplicidades e a atribuição dos átomos de ^1H de H_2L^1 .

Atribuições	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
1	11,09	Simpleto	1,0
2	8,09	Quarteto	1,01
3	7,40	Tripleto	1,02
4	2,93	Dupleto	3,07
5	2,22	Quarteto	2,02
6	1,69	Quinteto	1,02

Estão presentes no espectro oito sinais mais relevantes. O sinal em 3,34 ppm e 2,50 ppm são característicos de H₂O residual do produto e do solvente da análise, o DMSO-d₆, respectivamente. É importante frisar que a molécula é simétrica, logo os ambientes químicos dos hidrogênios análogos serão equivalentes, porém no gráfico e na tabela as integrais mostram somente a quantidade de um dos espelhos da simetria. O primeiro sinal do composto aparece em 1,69 ppm (**6**), um quinteto que integra para 1 átomo de hidrogênio referente ao metileno central da molécula, por onde passa o plano de simetria mencionado. Em 2,22 ppm (**5**) o sinal mostra um quarteto integrando para 2 hidrogênios, estes do grupo -CH₂-CH₂-CH=N-. O último sinal do pacote dos grupos menos desblindados da molécula tem seu deslocamento químico em 2,93 ppm (**4**) um duplete que integra para 3 átomos de hidrogênio encontrados na metila terminal. O pico (**3**) é um tripleto que integra para 1 hidrogênio, em 7,40 ppm, do grupo -CH=N- da imina. A separação dos picos do sinal em 8,09 ppm (**2**) foi baixa, mas há dois ombros de cada lado do multipletto que indicam que é um quarteto, integrando para 1 hidrogênio, este ligado ao nitrogênio da parte da tioamida. Por fim, o sinal que aparece em 11,09 ppm (**1**) é um simpleto que integra para um hidrogênio e é o sinal mais desblindado porque sua vizinhança próxima está cercada de átomos e grupos retiradores de densidade eletrônica, como os outros dois nitrogênios, as duplas ligações e o enxofre. Foram descritos os 9 hidrogênios que compõe um dos espelhos de simetria molecular e, multiplicando estes valores por dois, obtemos o valor total de todos os 18 prótons da estrutura molecular proposta para o H₂L¹. O espectro de RMN de ¹³C e a tabela de atribuição destes sinais para o ligante H₂L¹ são apresentados a seguir (Figura 4.12 e Tabela 4.6).

FIGURA 4.12. Espectro de RMN de ¹³C de H₂L¹ (em DMSO-d₆, 11,74T).

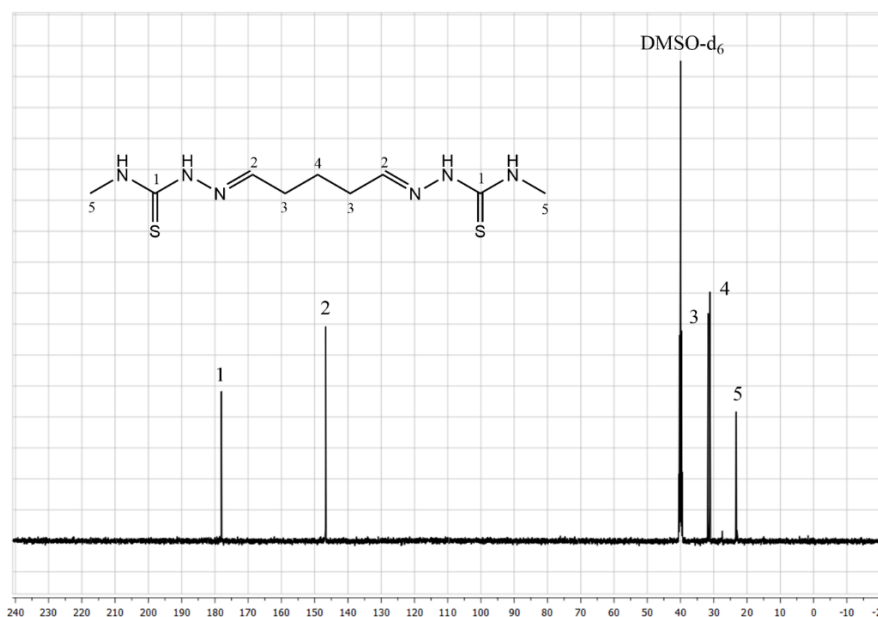


TABELA 4.6. Valores de deslocamento químico e as atribuições para os núcleos de ^{13}C obtidos para H_2L^1 .

Atribuição	δ (ppm)
1	178,03
2	146,66
3	31,69
4	31,16
5	23,23

Novamente, como a molécula apresenta simetria, o ambiente químico dos carbonos da estrutura é análogo e no espectro somente são observados aqueles átomos de um dos espelhos do composto. Assim, o espectro apresenta os 5 sinais de ressonância que eram esperados de acordo com a estrutura proposta. O sinal mais desblindado do composto ocorre no deslocamento químico de 178,09 ppm (**1**) atribuído aos carbonos das porções das tioureias da molécula. Em seguida, na região de 146,66 ppm (**2**) foi atribuído o sinal aos carbonos imínicos. Enquanto os carbonos mais blindados da molécula, foram atribuídos os deslocamentos em 31,69 ppm (**3**) para os carbonos dos metilenos mais próximos aos grupos imínicos, 31,16 ppm (**4**) ao carbono de metileno do eixo simétrico e, por fim, 23,23 ppm (**5**) das metilas terminais.

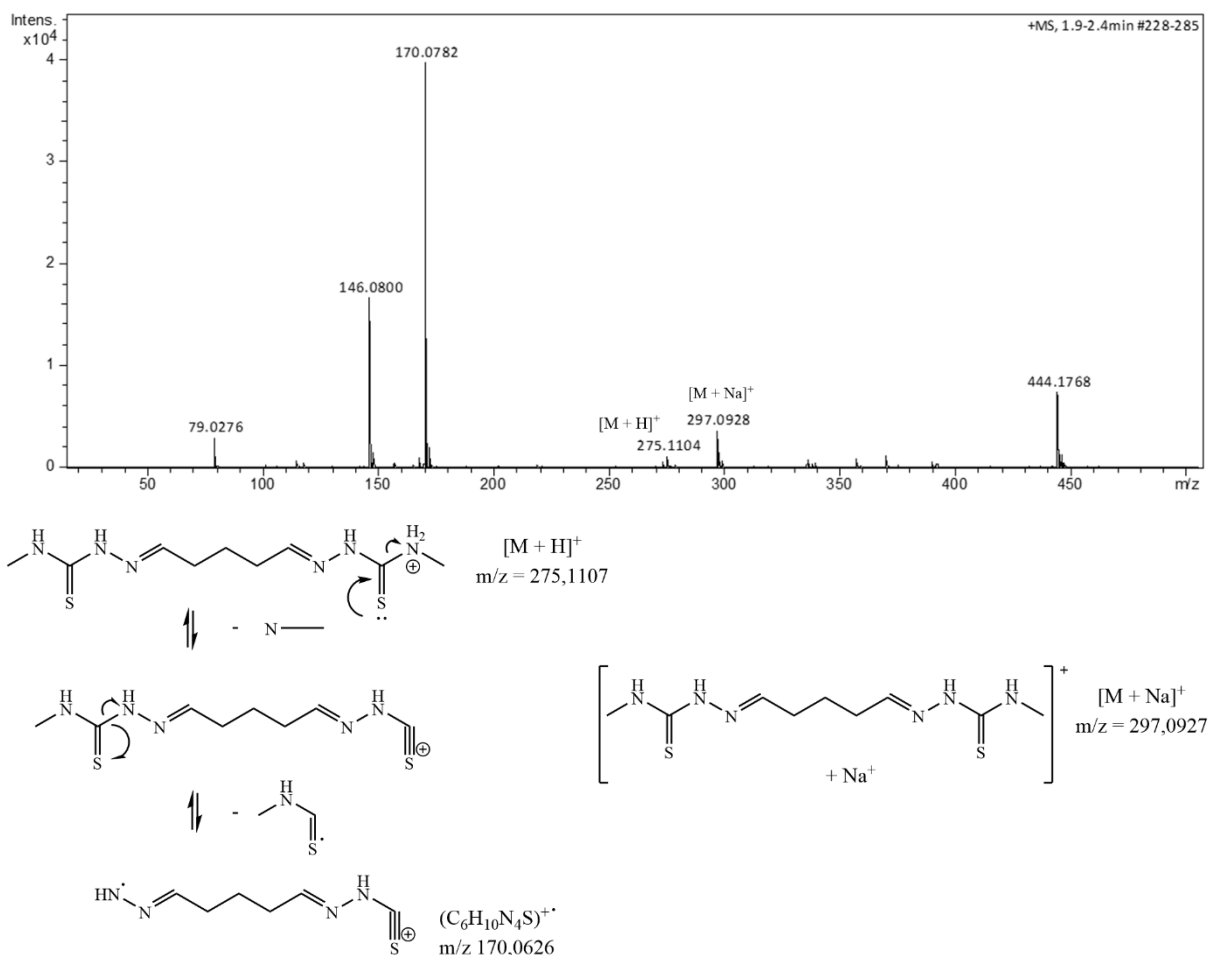
4.1.5. Espectrometria de Massas para H_2L^1

A técnica de espectrometria de massas também foi usada para investigar a estrutura molecular deste novo ligante. O espectro ESI(+)-MS foi realizado no modo positivo e as estruturas de fragmentação propostas estão de acordo com as distribuições isotópicas esperadas para este composto. A Figura 4.13 traz este espectro realizado e em seguida a estrutura das principais fragmentações. Todos os valores de massa são referentes às massas monoisotópicas dos compostos, ao invés da sua massa média.

A amostra foi dissolvida em metanol e diluída numa mistura metanol:água na proporção de 1:1. De acordo com o observado pelos gráficos, é possível identificar as principais razões massa/carga (m/z) encontradas para os respectivos cátions de fragmentação do composto, como o pico $[\text{M} + \text{H}]^+$ com m/z 275,1107. Já o pico em 297,0928 indica a formação do auto $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Este aduto pode ocorrer intencionalmente via mecanismos de cationização ou não intencionalmente devido aos usos prolongados e contínuos do equipamento, ocorrendo de forma comum nas análises feitas por infusão direta. Por mais que a protonação do composto seja uma

forma de cationização, o próprio termo “cationização” é mais utilizado quando nos referimos a formação de um aduto catiônico que não seja via protonação.

FIGURA 4.13. Espectro ESI(+)-MS para H₂L¹ e as estruturas de fragmentações e sinais mais relevantes.



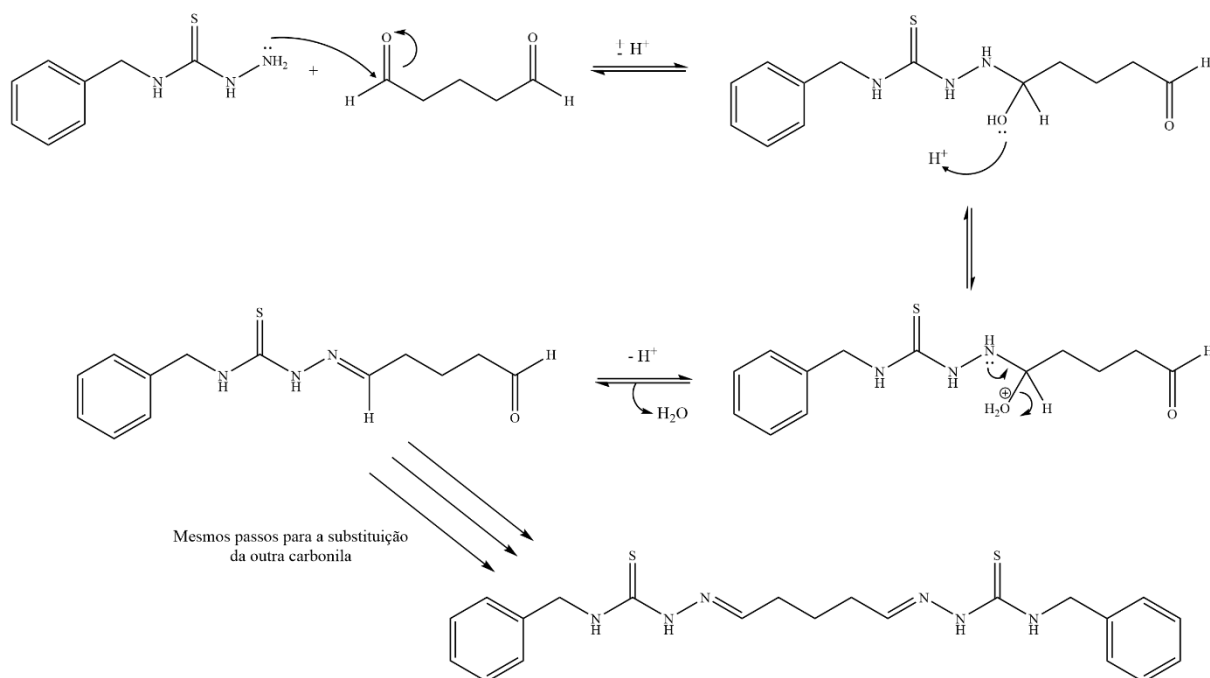
A cationização envolve a adição não-covalente de um íon positivamente carregado a uma molécula neutra, resultando em um complexo carregado (Siuzdak, 1996). Com essa informação, a observação de dois adutos iônicos de dois diferentes cátions é uma boa confirmação da massa do composto. O pico base, de m/z 170,0626 refere-se ao cátion $(C_6H_{10}N_4S)^+$.

Partindo da análise de todas as técnicas de caracterização experimental com a hipótese estrutural proposta para a nova molécula H₂L¹ é possível concluir que ela foi sintetizada e caracterizada com sucesso, abrindo o caminho para o seguimento da etapa de síntese inorgânica do seu respectivo complexo de ouro.

4.2. Caracterização da estrutura molecular de H_2L^2

A síntese do ligante H_2L^2 foi feita de maneira similar à síntese de H_2L^1 , somente trocando a natureza da tiossemicarbazida. Não ocorreram problemas em relação ao solvente como nas primeiras tentativas descritas anteriormente, pois esta já foi inicialmente feita utilizando acetonitrila como o meio reacional, atingindo também, a reprodutibilidade desejada e a seguinte rota de mecanismo da formação de H_2L^2 a partir do glutaraldeído e a 4-benzil-3-tiossemicarbazida é proposta, sendo análoga ao primeiro ligante (Figura 4.14):

FIGURA 4.14. Mecanismo de reação proposto para a síntese do ligante H_2L^2 .



O nitrogênio da hidrazina da 4-benzil-3-tiossemicarbazida ataca a carbonila do glutaraldeído, também formando a espécie hemiaminal e o oxigênio da carbonila é protonado a partir de uma transferência de prótons. A nova hidroxila, por conseguinte, é protonada e agora como um bom grupo de saída, o par de elétrons do mesmo nitrogênio ataca o carbono formando a imina e dá origem à base de Schiff monosubstituída do glutaraldeído. Os mesmos passos de reacionais são repetidos para a outra carbonila que resulta no produto final desejado, o H_2L^2 .

4.2.1. Rendimento, Ponto de Fusão e Análise Elementar para H_2L^2

Novamente, os resultados destas análises do composto fornecem os dados necessários para predizer, de maneira primária, o sucesso de sua síntese.

TABELA 4.7. Análise elementar, temperatura de fusão e rendimento do composto H_2L^2 , assim como sua fórmula molecular e massa molar.

Análise Elementar			Temperatura de Fusão	Rendimento
Teórico	Experimental	$ \Delta $		
C: 59,13	C: 58,48%	C: 0,69%	48 °C – 52 °C	62,6% (133,6 mg)
H: 6,14%	H: 6,12%	H: 0,02%		
N: 19,7%	N: 19,45%	N: 0,25%		
Fórmula Molecular			Massa Molar	
$C_{21}H_{26}N_6S_2$			426,60 g/mol	

4.2.2. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para H_2L^2

Uma análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada no composto. A Tabela 4.8 mostra as principais frequências de ligação obtidos do espectro para H_2L^2 , assim como o respectivo espectro na Figura 4.15.

FIGURA 4.15. Espectro de infravermelho de H_2L^2 e a frequência (cm^{-1}) dos modos vibracionais das ligações mais relevantes.

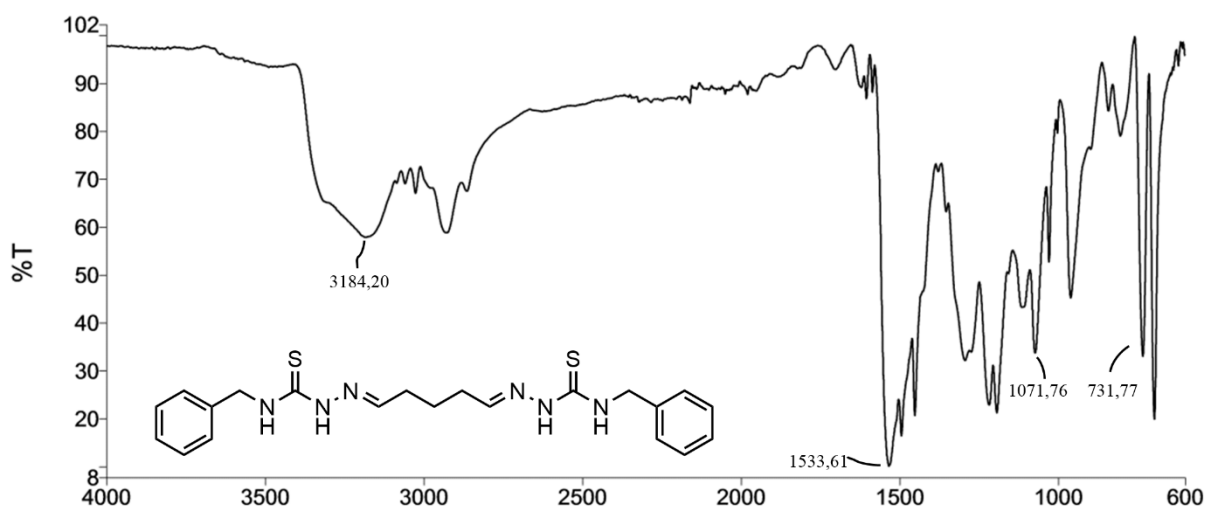


TABELA 4.8. Frequências (cm^{-1}) dos modos vibracionais mais relevantes das ligações do composto H_2L^2 .

	$\nu(N-H)$	$\nu(C=N)$	$\nu(C=S)$
H_2L^2	3184,20	1533,61	1071,76 e 731,77

O espectro de infravermelho mostra com clareza as vibrações dos grupos funcionais mais característicos presentes na estrutura molecular proposta para o H₂L², e os valores de número de onda para os modos vibracionais desta molécula caem em regiões muito similares quando comparados aos valores para H₂L¹, já que são moléculas análogas. Na região de 3184,20 cm⁻¹ e 1533,61 cm⁻¹ ocorrem os estiramentos das ligações N-H e C=N, respectivamente e também de acordo com o esperado na literatura, não sendo deslocados para números de onda menores, pois não há nenhum tipo de conjugação de duplas ligações. Também são evidentes os sinais referentes ao estiramento da ligação C=S, observados nas regiões de 1071,76 e 731,77 cm⁻¹, e descritos por Wiles e colaboradores (Wiles, 1967). Uma diferença notável entre os espectros de H₂L¹ e H₂L² é o aparecimento, neste último, do *overtone* dos anéis aromáticos na região de 2000 cm⁻¹. Estes sinais fracos ocorrem devido ao dobramento fora do plano dos anéis. Mais uma vez faz-se necessário perceber que a falta de sinais no espectro de infravermelho é indicativo de estrutura molecular e, assim como em H₂L¹, a falta do estiramento C=O de aldeído, na região entre 1740 - 1720 cm⁻¹ mostra a efetiva substituição de ambas as carbonilas do glutaraldeído, o sinal duplo na região de 2800 – 2700 cm⁻¹ do estiramento característico C-H de aldeídos é ausente e o estiramento da ligação S-H na região de 2550 cm⁻¹, ausente, nos informa que no estado sólido o composto existe na forma do seu tautômero tiona, ao invés do tiol.

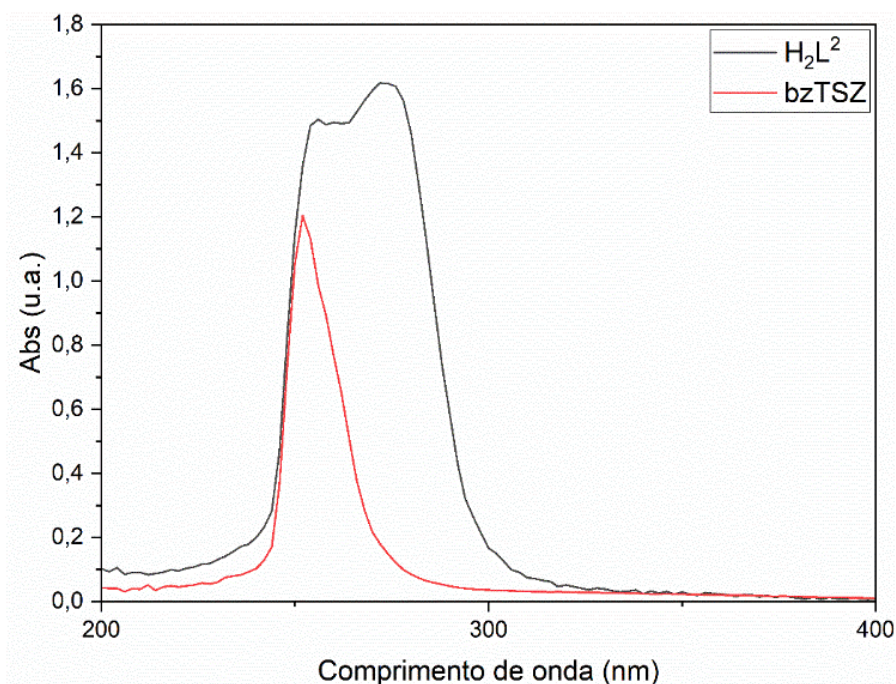
4.2.3. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta para H₂L²

Foi feita uma análise de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível na molécula de H₂L² e seu reagente de partida 4-benzil-3-tiossemicarbazida, para observar as transições eletrônicas presentes na estrutura. As soluções foram feitas na concentração de 0,335·10⁻³ mol/L em dimetilsulfóxido.

Primeiramente, é possível perceber que o perfil de absorção desta molécula é semelhante ao observado na sua análoga H₂L¹, porém com algumas ligeiras diferenças. O espectro referente à molécula de partida bzTSZ, em vermelho, apresenta um λ_{máx} de absorção em 252 nm e com uma maior intensidade que mTSZ. Este comprimento de onda é responsável pela característica transição π → π* da região da tioamida da molécula (Ronconi, 2005; Criado, 1992; Pavia, 2001). A absorção do anel não é observada, pois reside em comprimentos de onda menores que o limite do equipamento que é de 200 nm. Já o espectro em preto, referente à molécula de H₂L², demonstra um perfil diferente que o visto em vermelho do seu reagente de partida. É uma banda mais larga que absorve uma maior quantidade de comprimentos de onda, causa direta de ser

uma molécula maior e com um arranjo diferente de orbitais moleculares quando comparado aos seus reagentes iniciais.

FIGURA 4.16. Espectro de absorção UV-Vis da solução de H_2L^2 e 4-benzil-3-tiossemicarbazida (bzTSZ) em DMSO numa concentração $0,335 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

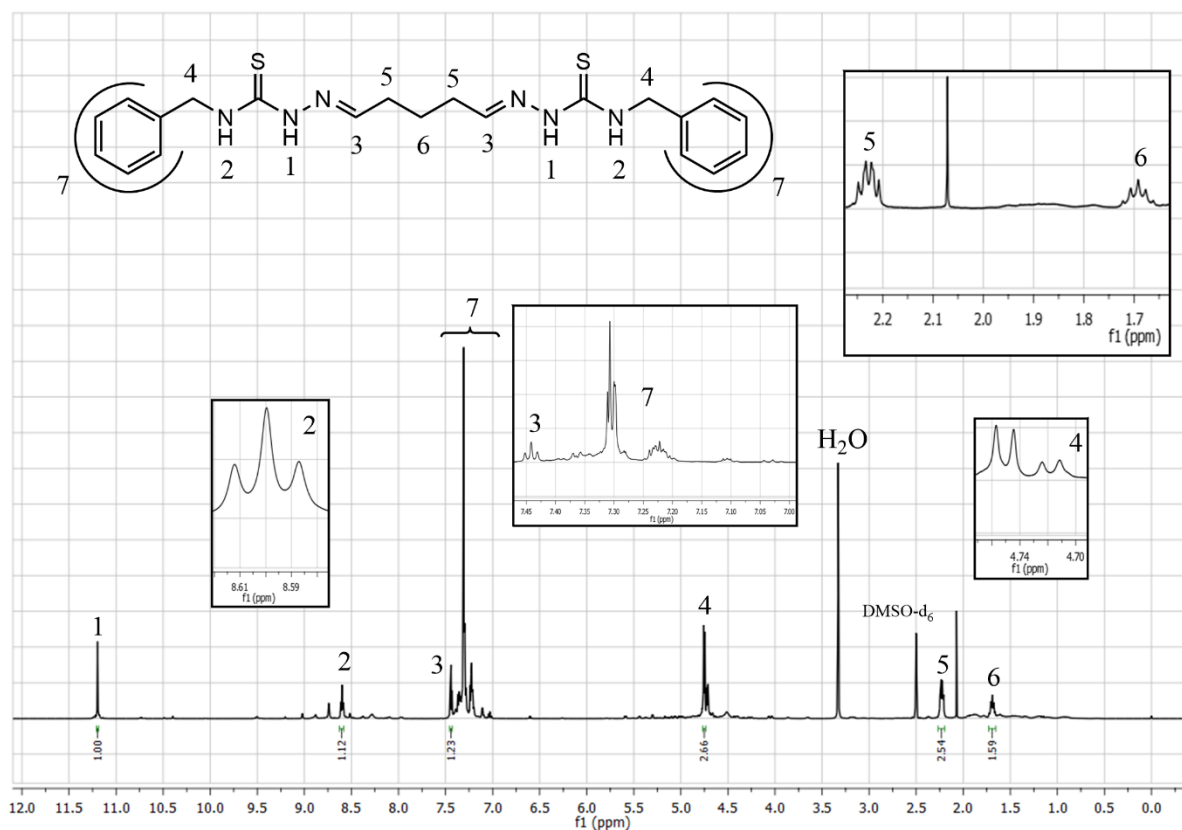


É importante frisar novamente que o glutaraldeído não foi incluído no gráfico pelo fato de não apresentar absorções com intensidades muito diferentes de zero, nesta concentração. O $\lambda_{\text{máx}}$ de H_2L^2 ocorre em 274 nm, transição $n \rightarrow \pi^*$ dos pares de elétrons não-ligantes dos átomos de enxofre (Criado, 1992). De maneira similar à feita anteriormente, a informação mais importante a se concluir da análise deste gráfico é que são apresentadas duas moléculas diferentes, o produto de síntese H_2L^2 dos seus reagentes de partida bzTSZ. O espectro de absorção de H_2L^2 em outras concentrações encontra-se no Apêndice IV.

4.2.4. Ressonância Magnética Nuclear de 1H e ^{13}C para H_2L^2

O espectro de RMN de 1H para o ligante H_2L^2 está representado na Figura 4.17, e na Tabela 4.9 estão resumidos os valores das integrais como os padrões das multiplicidades e os seus deslocamentos químicos.

Foram atribuídos sete sinais mais relevantes de H_2L^2 . Primeiramente, os sinais em 3,34 ppm e 2,50 ppm são característicos de H_2O residual do produto e do DMSO- d_6 , respectivamente. Já o sinal em 2,1 ppm se deve a uma impureza residual de acetona utilizada para fazer a limpeza e secagem dos tubos de RMN entre análises.

FIGURA 4.17. Espectro de RMN de ^1H de H_2L^2 (em DMSO-d_6 , 11,74T).TABELA 4.9. Valores de deslocamento químico, integração, suas multiplicidades e a atribuição dos átomos de ^1H de H_2L^2 .

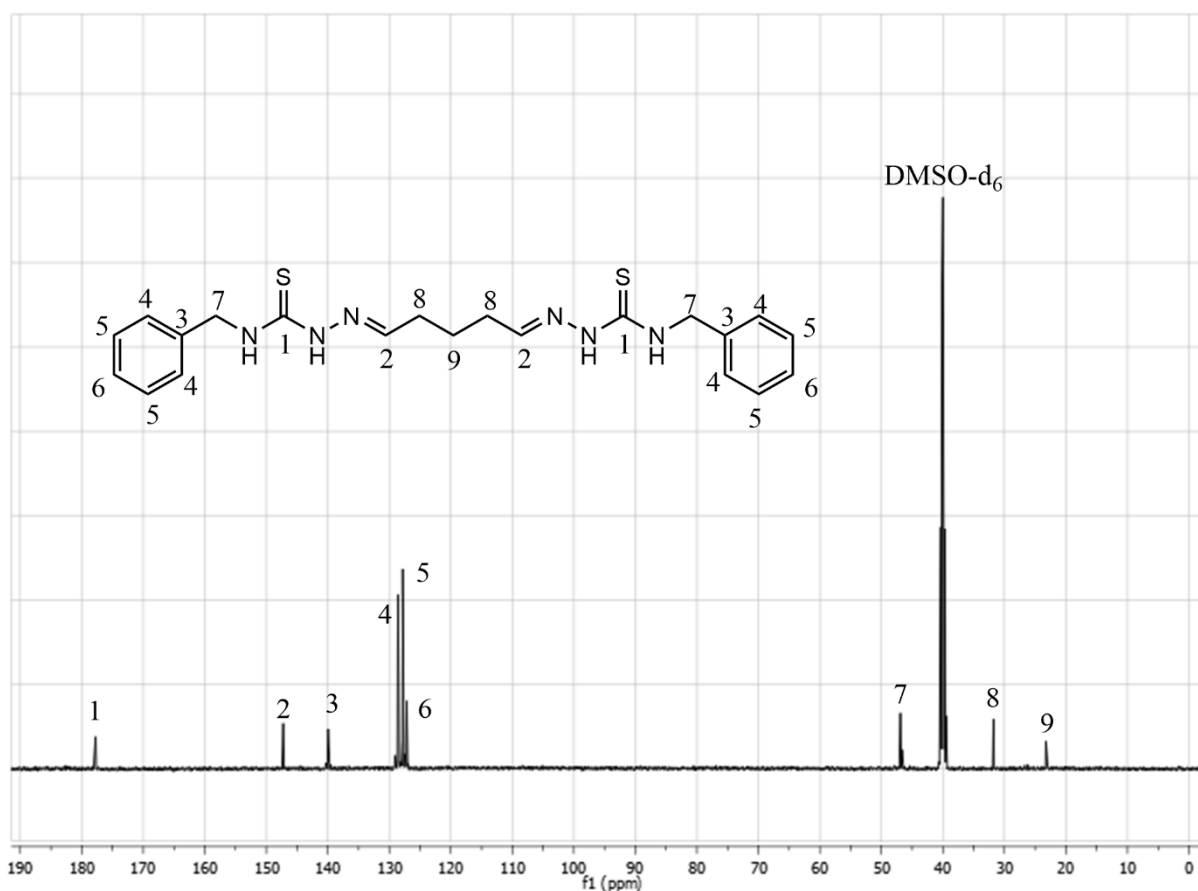
Atribuições	δ (ppm)	Multiplicidade	Integração
1	11,20	Simpleto	1,00
2	8,60	Tripleto	1,12
3	7,44	Tripleto	1,23
4	4,74	Dupleto	2,66
5	2,23	Quarteto	2,54
6	1,69	Quinteto	1,59
7	7,40 – 7,01	-	-

A molécula também é simétrica, logo as integrais tomadas geram valores que equivalem à metade dos hidrogênios totais àquele respectivo sinal, já que os ambientes químicos dos prótons simétricos são equivalentes. Ao fazer o paralelo de análise com H_2L^1 , é possível já prever que os sinais dos prótons pertencentes a porções iguais das moléculas devem ocorrer, virtualmente, nas mesmas regiões de deslocamento químico. Outro fato importante a ser destacado ao analisar este espectro é o fato da quantidade de impurezas presentes. Como o produto formado

após a evaporação do solvente é uma espécie de óleo mais rijo, ou seja, não é purificado por cristalização como H_2L^1 , existem subprodutos e reagentes de partida na amostra utilizada na análise e isso pode interferir no valor das integrações. De toda forma, as partes inteiras destes valores aproximam-se do ideal inteiro esperado.

O primeiro sinal mais blindado do composto H_2L^2 aparece em 1,69 ppm (**6**), um quinteto que integra para 1,59 átomos de hidrogênio referente ao grupo $-CH_2-$ central da molécula. Em 2,23 ppm (**5**) o sinal mostra um quarteto integrando para 2,54 hidrogênios, estes dos grupos $-CH_2-CH_2-CH=N-$. O sinal (**4**) foi atribuído ao pico em 4,74 ppm referente ao grupo $-CH_2-$ benzílico, integrando para 2,66 hidrogênios e é o primeiro pico que não existe no espectro de H_2L^1 . Na região de 7,40-7,01 ppm encontram-se os multipletos formados pelos hidrogênios dos anéis aromáticos (**7**), também inexistentes na molécula de H_2L^1 . Foi somente possível caracterizá-los pela sua faixa de deslocamento químico, pois há uma interferência relevante entre os átomos de H da molécula de interesse e das impurezas fazendo com que o valor da integral sobre este intervalo de δ atinja valores muito acima do esperado. Em (**3**) foi atribuído o sinal em 7,44 ppm, outro sinal análogo ao que ocorre em H_2L^1 , do próton $-CH=N-$ da base de Schiff, um tripleto integrando para 1,23 átomos de hidrogênios. Os dois últimos sinais a serem descritos são sobre os H mais desblindados da molécula, visto que estão ligados diretamente a átomos de nitrogênio. O sinal (**2**) em 8,60 ppm que integra para 1,12 hidrogênios relativo ao próton da porção da tioamida e em seguida, (**1**) em 11,20 ppm, o próton mais desblindado da molécula, ligado ao nitrogênio da porção da hidrazina. Todos os hidrogênios da molécula de H_2L^2 puderam ser identificados de forma qualitativa, mas ainda é preciso realizar purificações para que seja possível quantificar a quantidade de prótons com mais precisão, mesmo que os valores apresentados tenham certa proximidade com o esperado. O espectro de RMN de ^{13}C também foi obtido (Figura 4.18) e a atribuição destes sinais para o ligante H_2L^2 (Tabela 4.10) são apresentadas a seguir.

Aqui, a simetria faz-se presente e os sinais observados, mais uma vez, dizem respeito somente aos átomos de carbono de um dos reflexos. Assim, o espectro apresenta os 9 sinais de ressonância que eram esperados de acordo com a estrutura proposta. A diferenciação dos carbonos dos metilenos distribuídos pela molécula é simples e envolve somente qual dos carbonos é mais ou menos desblindado.

FIGURA 4.18. Espectro de RMN de ^{13}C de H_2L^2 (em DMSO-d_6 , 11,74T).TABELA 4.10. Valores de deslocamento químico e as atribuições para os núcleos de ^{13}C obtidos para H_2L^2 .

Atribuição	δ (ppm)
1	177,75
2	147,25
3	139,94
4	128,59
5	127,81
6	127,18
7	46,95
8	31,79
9	23,26

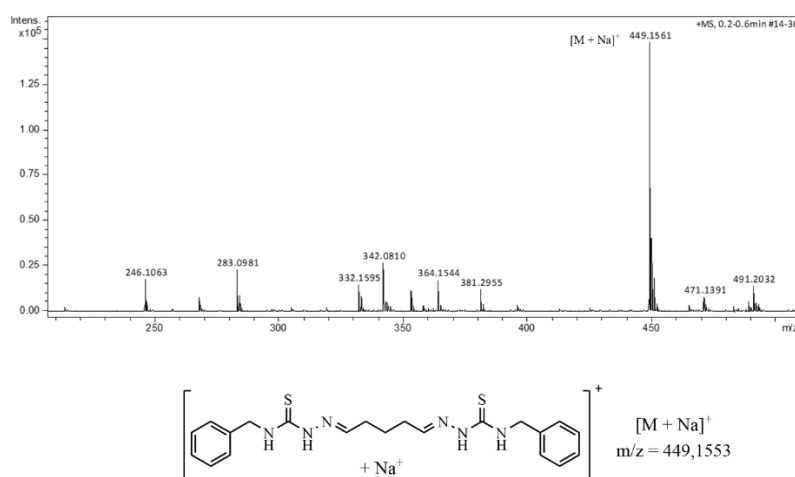
Em 46,95 ppm foi atribuído o sinal (7) para o metileno benzílico, já que é o único dos metilenos presentes que está ligado com um átomo mais eletronegativo que o carbono, neste caso é o nitrogênio do grupo da tioamida. O próximo metileno mais desblindado é o (8), em 31,79 ppm, e apesar de seus átomos vicinais serem carbonos também, ele ainda assim está relativamente próximo do nitrogênio retirador de densidade eletrônica da imina. Por último, o metileno central da molécula é o mais blindado dos três e foi atribuído como (9) em 23,36 ppm. Na faixa de 140 – 127 ppm estão contidos os seis carbonos do anel aromático e foram atribuídos

co mas seguintes ressonâncias: **(3)**: 139,94 ppm, **(4)**: 128,59 ppm, **(5)**: 127,81 ppm e **(6)**: 127,18 ppm. Os dois carbonos **(4)** e **(5)** aparecem somente com um sinal em anéis monosubstituídos por simetria.⁶⁷ Os dois restantes carbonos mais desblindados são o **(2)**, em 147,25 ppm, para o carbono da imina e **(1)**, em 177,75 ppm, para o carbono da porção da tiouréia.

4.2.5. Espectrometria de Massas para H₂L²

A técnica de espectrometria de massas também foi usada para investigar a estrutura molecular de H₂L². O espectro ESI(+)-MS foi realizado no modo positivo e a Figura 4.19 traz o espectro e a respectiva estrutura das fragmentações mais relevantes. Todos os valores de massa são referentes às massas monoisotópicas dos compostos, ao invés da sua massa média.

FIGURA 4.19. Espectro ESI(+)-MS para H₂L² e a estrutura mais abundante do seu espectro de massas.

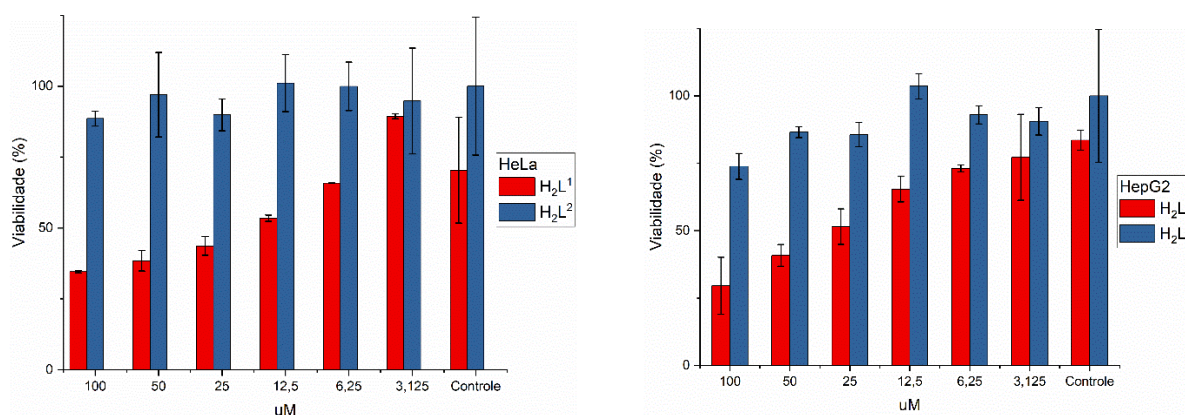


A amostra foi dissolvida em DMSO e diluída em metanol. O gráfico apresenta somente um grande pico de relevância que é o pico base. A razão massa/carga deste pico é de 449,1561 e a diferença para a massa monoisotópica de H₂L² livre é de 426,1660, ou seja, a diferença entre estes valores é de exatamente 22,99, a massa de um átomo de sódio. Novamente observamos aqui o mecanismo de cationização e formação do aduto [M + Na]⁺ como visto em H₂L¹, porém desta vez este é o pico base do espectro de massas (Siuzdak, 1996). A formação deste aduto é uma boa confirmação da massa do composto e assim, junto de todas as informações obtidas de todas as outras técnicas discutidas para H₂L², é possível concluir que a nova molécula foi sintetizada e caracterizada com sucesso e pode então ser utilizada nas próximas etapas de síntese dos complexos.

4.3. Avaliação da atividade antiproliferativa nos ensaios de viabilidade celular para H₂L¹ e H₂L²

Os ensaios de viabilidade celular para atestar a capacidade antiproliferativa dos compostos estudados foi realizada contra as linhagens de células de câncer de colo do útero (HeLa) e de câncer de fígado (HepG2). Os resultados dos ensaios, após a utilização de variadas concentrações de H₂L¹ e H₂L², estão representados na Figura 4.20.

FIGURA 4.20. Efeitos de H₂L¹ e H₂L² na viabilidade das células de HeLa e HepG2. As células foram incubadas por 24 horas com concentrações que variaram de 3,125 µM até 100 µM, utilizando o ensaio colorimétrico MTS para avaliar a viabilidade. Os dados representam a média de três experimentos independentes e seus desvios padrão.



Os gráficos de barras mostram a porcentagem de células viáveis após 24 horas do tratamento com os ligantes. Logo, quanto mais alta estão as barras, maior a viabilidade celular e menor a citotoxicidade do composto. As duas barras de controle expressam o valor da viabilidade do meio com 0,5% (v/v) de DMSO (em vermelho) e somente o meio (em azul). É possível analisar de forma clara as duas tendências diferentes entre os ligantes. Primeiramente o ligante H₂L¹ segue a tendência comumente encontrada na literatura da relação direta de dose-resposta, ou seja, quanto maior a concentração dos compostos, maior sua citotoxicidade e menor a viabilidade. H₂L¹ possui uma toxicidade mais alta contra a linhagem tumoral HeLa que HepG2, produzindo uma menor viabilidade celular em concentrações mais baixas. Em contrapartida, H₂L² não possui nenhuma citotoxicidade relevante contra as linhagens de células testadas nas concentrações empregadas. A flutuação na viabilidade se dá mais pelo efeito do DMSO que de fato da própria molécula. Estes dados colocam em discussão a importância da estrutura molecular para a atividade biológica de um composto. Vemos aqui que ambas moléculas são da classe das tiossemicarbazonas, porém só uma apresenta algum tipo de atividade. A diferença entre as duas, como já mostrado, somente é a sua cadeia carbônica final, comportando uma metila (H₂L¹) ou um grupo benzila (H₂L²). O grande volume do grupamento benzila interfere

na solubilidade e lipofilicidade da molécula, podendo ser incompatível com a membrana plasmática das células e um dos motivos responsáveis pelo seu perfil apresentado na figura 4.20.

O IC_{50} , concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular, foi calculada para os dois compostos utilizando o programa Origin 2022 através de ajuste de curva não-linear em modelo dose-resposta. Os gráficos obtidos se encontram no Apêndice V. A partir do exposto na Tabela 4.11, o ligante H_2L^1 possui um IC_{50} contra HeLa bastante relevante, e menor que o observado pela cisplatina na mesma linha tumoral (cerca de 22,4 μM em 24 horas) (Becit, 2020). Um ponto em especial merece ser enfatizado sobre a análise de H_2L^1 em HeLa. Durante o tratamento dos dados, estes não convergiram no ajuste da curva de dose-resposta. Com isso, não existem valores de desvio-padrão e este dado torna-se menos confiável. Em relação à HepG2, seu IC_{50} foi semelhante ao da cisplatina na mesma linha tumoral (25,5 μM em 24 horas). H_2L^2 não apresentou atividade citotóxica relevante, já que seu IC_{50} possui um valor maior que 100 μM . Os desvios-padrão são relativamente altos devido à metodologia empregada, já que o volume de solução dos compostos utilizado por poço é somente de 0,5 μL , o que pode comprometer a qualidade dos resultados.

TABELA 4.11. Valores de IC_{50} apresentando a atividade citotóxica dos compostos H_2L^1 e H_2L^2 , em μM , contra as células de câncer de colo do útero (HeLa) e câncer de fígado humano (HepG2).

Compostos	HeLa	HepG2
H_2L^1	7,74 (\pm *)	32,40 (\pm 8,96)
H_2L^2	> 100	> 100

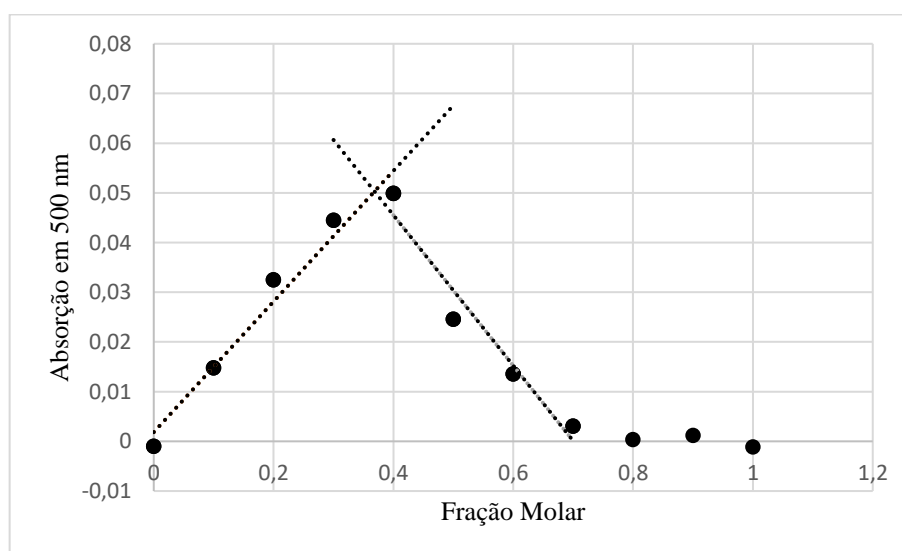
4.4. Possibilidade de síntese de complexos de ouro utilizando os ligantes H_2L^1 e H_2L^2

Durante todo o processo de síntese e caracterização das tiossemicarbazonas, ocorreram concomitantemente as experimentações envolvendo a sínteses dos seus respectivos complexos de ouro. Os primeiros passos consistiram em realizar um experimento baseado no método de variações contínuas, o Job's Plot (Tabela 4.12). É usado para determinação de estequiometria de complexos, variando volumes dos compostos para obter informações sobre qual razão metal:ligante gera a maior absorção quando aplicada uma varredura na região do ultravioleta-visível. O gráfico é plotado com o valor das absorções máximas, fixadas no comprimento de onda de 500 nm, no eixo das ordenadas e a fração molar do ligante no eixo das abscissas (Figuras 4.21 e 4.22). O espectro de absorção obtido da varredura do Job's Plot se encontra no Apêndice IV.

TABELA 4.12. Dados do Job's Plot para H_2L^1 e o sal $\text{H}[\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. A concentração máxima de ambas as soluções foi de $0,66\cdot 10^{-3}$ M e o solvente utilizado foi etanol. X corresponde a fração molar do H_2L^1 . A mesma tabela também serve para descrever o experimento realizado com H_2L^2 , já que todas as concentrações foram as mesmas.

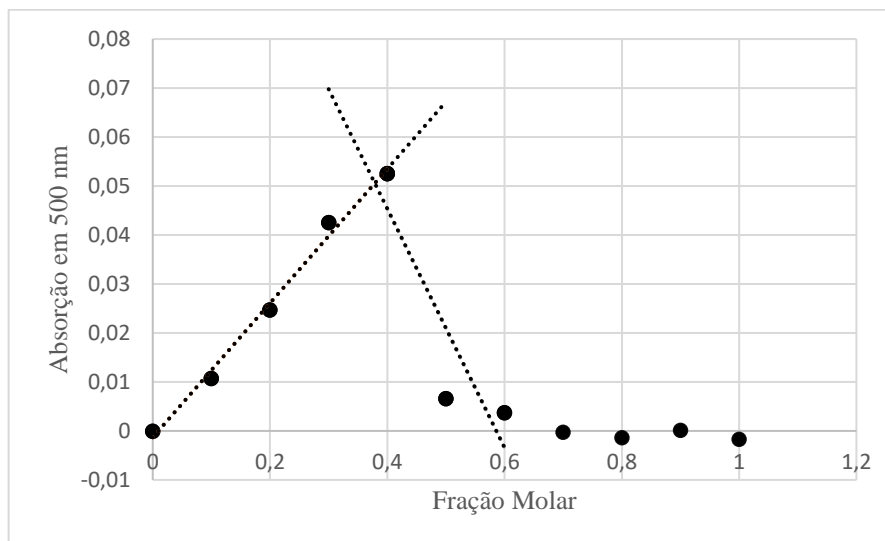
Volume H_2L^1 (μL)	Volume Au^{III} (μL)	Mol H_2L^1 ($\times 10^{-8}$)	Mol Au^{III} ($\times 10^{-8}$)	Fração Molar de H_2L^1
100	0	6,6	0	1
90	10	5,94	0,66	0,9
80	20	5,28	1,32	0,8
70	30	4,62	1,98	0,7
60	40	3,96	2,64	0,6
50	50	3,3	3,3	0,5
40	60	2,64	3,96	0,4
30	70	1,98	4,62	0,3
20	80	1,32	5,28	0,2
10	90	0,66	5,94	0,1
0	100	0	6,6	0

FIGURA 4.21. Estudo da estequiometria dos complexos formados entre o sal de ouro(III) e o ligante H_2L^1 .



A retas se encontram em uma fração molar do ligante $X \sim 0,4$, indicando um ponto de proporção que fica entre 1:1,5 (ligante:metal) e 1:2,3 (ligante:metal), sugerindo então que a absorção máxima, ou seja, a maior formação de complexo se dá em uma proporção próxima de 1:2 (ligante:metal) para H_2L^1 .

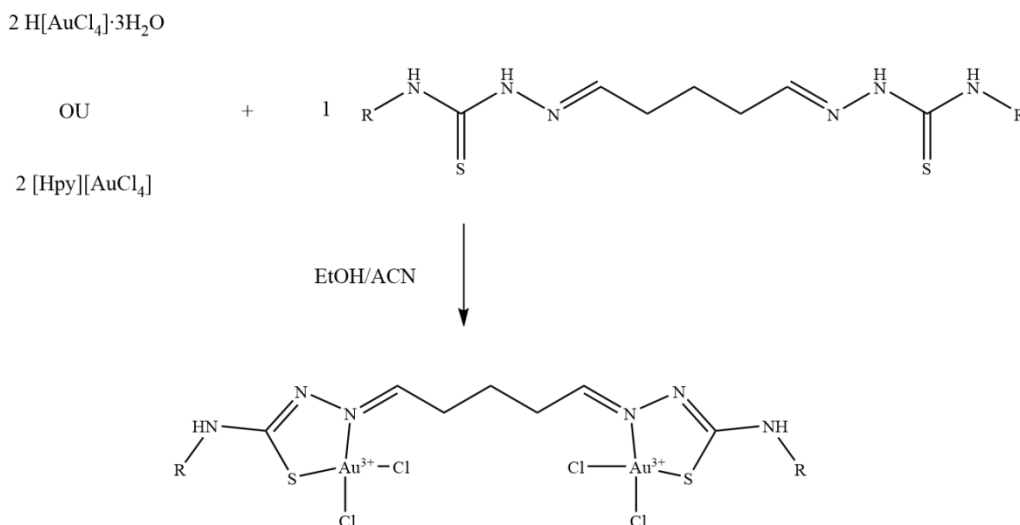
FIGURA 4.22. Estudo da estequiometria dos complexos formados entre o sal de ouro(III) e o ligante H_2L^2 .



Neste gráfico, o mesmo comportamento geral que acontece para H_2L^1 pode ser observado para H_2L^2 , um dado esperado já que as estruturas moleculares dos ligantes são muito próximas e os sítios de coordenação são virtualmente os mesmos. Aqui, $X \sim 0,4$, também caindo numa proporção ideal de 1:2 (ligante:metal). Com estes dados em mente norteando as proporções, as sínteses dos complexos foram iniciadas.

Diversas reações foram feitas testando diferentes condições reacionais. Um esboço geral (Figura 4.23) para as sínteses dos complexos utilizando ambos os ligantes foi: em um balão de fundo redondo, sob agitação magnética e temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mmol (39,3 mg) de $H[AuCl_4] \cdot 3H_2O$ ou de seu derivado (41,8 mg) $[Hpy][AuCl_4]$ dissolvido em 5 mL de etanol absoluto ou acetonitrila. Foram solubilizados 0,05 mmol (13,72 mg) de H_2L^1 ou (21,33 mg) de H_2L^2 em 5 mL de etanol absoluto ou acetonitrila em um béquer, utilizando primeiramente um bastão de vidro para quebrar o soluto em partes menores seguido de ultrassom devido à baixa solubilidade do ligante nestes solventes. Após este tratamento, a solução do ligante foi adicionada à do sal de ouro(III) e a mistura permaneceu sob agitação durante 1 hora. A solução-mãe possuía uma coloração laranja-tijolo e um precipitado marrom, que foi centrifugado e o sobrenadante retirado e armazenado, enquanto o sólido foi colocado em um dessecador à vácuo. Após 2 dias no vácuo, um produto sólido e escuro foi utilizado para dar seguimento às caracterizações.

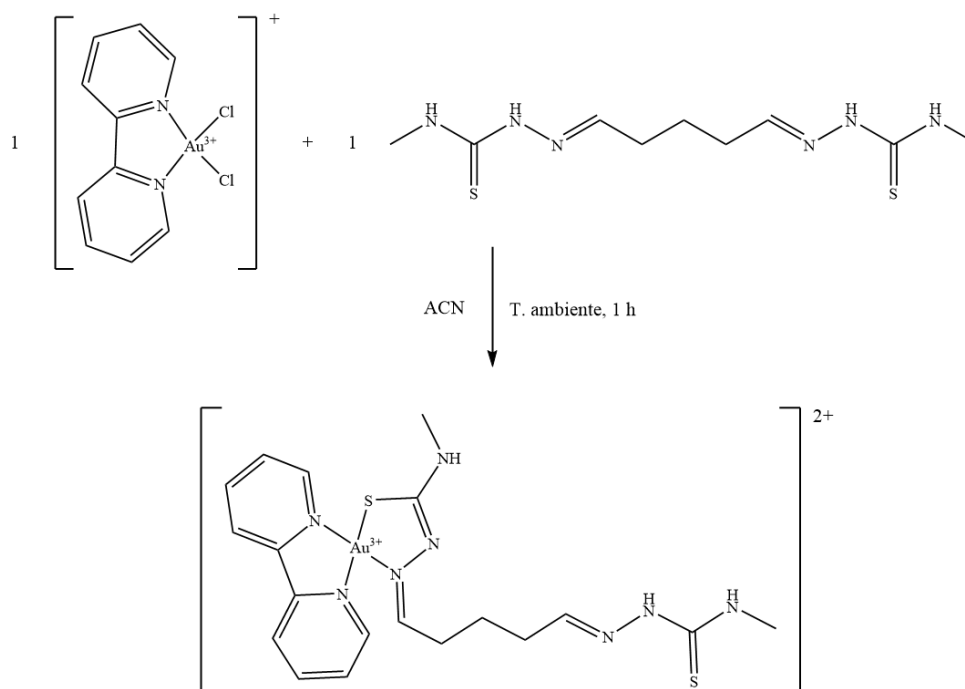
FIGURA 4.23. Esquema da reação de complexação pretendida entre os sais de ouro(III) e os ligantes H_2L^1 (R = metila) e H_2L^2 (R = benzila).



Os produtos obtidos de todas as reações feitas foram submetidos à análise elementar, ressonância magnética de próton e espectrometria de massas (os dados e espectros se encontram nos Apêndices III, I e II, respectivamente). Os resultados de análises elementares demonstraram porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio bastante diferentes das calculadas teoricamente, indicando um alto teor de impurezas ou subprodutos. Os dados de espectrometria de massas corroboram os dados obtidos de CHN. Há picos indicados no espectro que chegam a ter uma relação m/z de 1505,4, um bom indicativo da formação de polímeros de coordenação ou complexos multinucleares. Os espectros de RMN de 1H se tornaram inconclusivos, devido à grande quantidade de subprodutos produzidos. Essas hipóteses sobre a formação de diferentes formas plausíveis de compostos de coordenação tomaram conta de grande parte do tempo de análises e da concepção de novos experimentos, estes visando assegurar o controle da formação destes complexos pretendidos.

Um dos novos experimentos que geraram dados mais promissores sobre a síntese de complexos de ouro com os novos ligantes teve o objetivo de tentar estabilizar o centro metálico e assim ter mais segurança da formação dos novos complexos (Figura 4.24). A molécula escolhida para realizar tal trabalho foi a 2,2'-bipiridina. Ocupando dois dos quatro sítios de coordenação do ouro(III), rígida e plana, a bpy deixaria disponível somente outros dois sítios de coordenação lábeis e seriam esses dois os ocupados pelos ligantes TSZ. Para tanto, o sal $[Hpy][AuCl_4]$ foi transformado no novo reagente de partida $[Au(bpy)Cl_2]PF_6$.

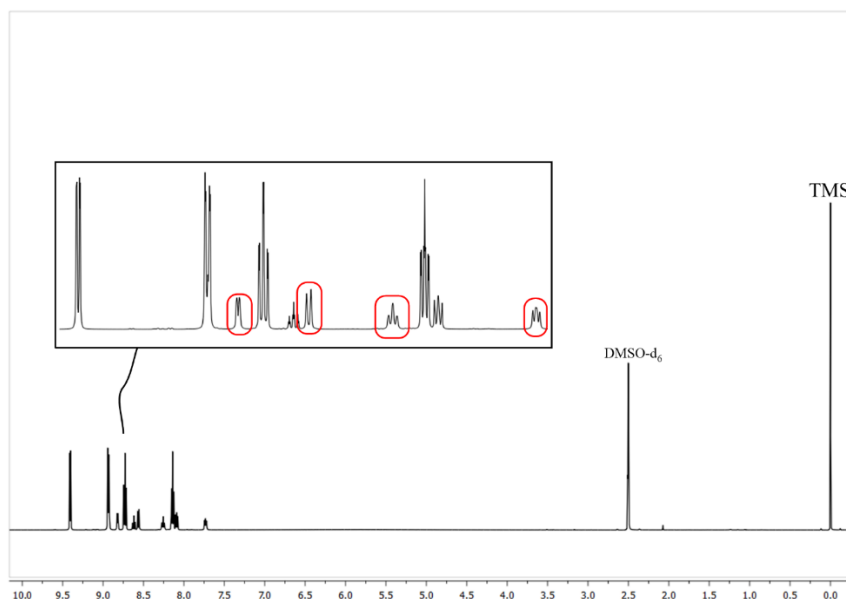
FIGURA 4.24. Esquema de síntese para a formação do complexo de ouro(III) utilizando a estratégia da bpy como um ligante estabilizador do centro metálico.



A síntese seguiu da seguinte forma: 0,1 mmol (56,9 mg) de $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$ foi dissolvida em 5 mL de ACN em um balão de fundo redondo, sob agitação magnética e temperatura ambiente. Em um béquer, 0,1 mmol (27,44 mg) de H_2L^1 foi solubilizado em 5 mL de ACN, com a ajuda de um ultrassom. As soluções foram misturadas, sob as mesmas condições. Imediatamente a solução obteve uma cor vermelha, que mudou para uma cor laranja-tijolo após meia hora de síntese. Ao final de uma hora total de reação, a cor permanecia a mesma. A solução-mãe foi rotaevaporada e o produto lavado com 3 alíquotas de 5 mL de H_2O deionizada fria e depois deixada para secar sobre sílica no dessecador durante um dia. Resultados interessantes surgiram da análise de RMN de ^1H e de espectrometria de massas do produto quando comparado com seu reagente inicial.

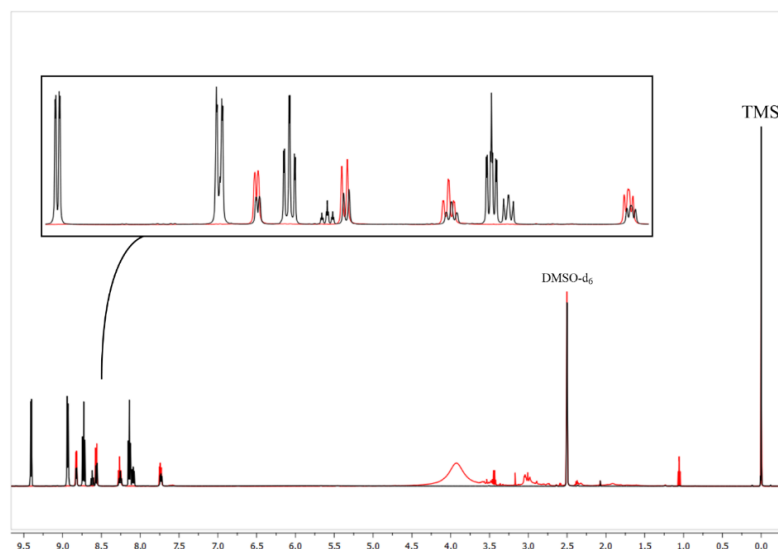
O espectro de RMN de ^1H do reagente $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$ (Figura 4.25) é condizente com a literatura (Casini, 2010; Cinellu, 2000). É possível observar o efeito de desblindagem que a coordenação traz aos prótons da bipyridina, já que no espectro há esses sinais mencionados e os sinais da bipyridina livre (como resíduo/impureza).

FIGURA 4.25. Espectro de RMN de ^1H para $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$. Destacado em vermelho estão os deslocamentos químicos dos sinais da bipyridina livre, enquanto os deslocamentos correspondentes à molécula coordenada estão mais desblindados e com maior intensidade.



Sobrepondo os espectros acima com o espectro de próton do produto final obtido da síntese (Figura 4.26), é possível comparar alguns sinais e seus deslocamentos químicos, sob uma ótica de análise qualitativa. Percebe-se que no produto os únicos sinais referentes aos δ dos hidrogênios da bpy se encontram exatamente nos mesmos valores que os prótons da mesma molécula quando livre. Teoricamente, o efeito de blindagem causado pela troca dos cloretos pelo ligante H_2L^1 não deveria acarretar uma queda no deslocamento químico dos prótons da bpy, e se acaso isto acontecesse, não os deslocaria para os mesmos δ da bpy livre.

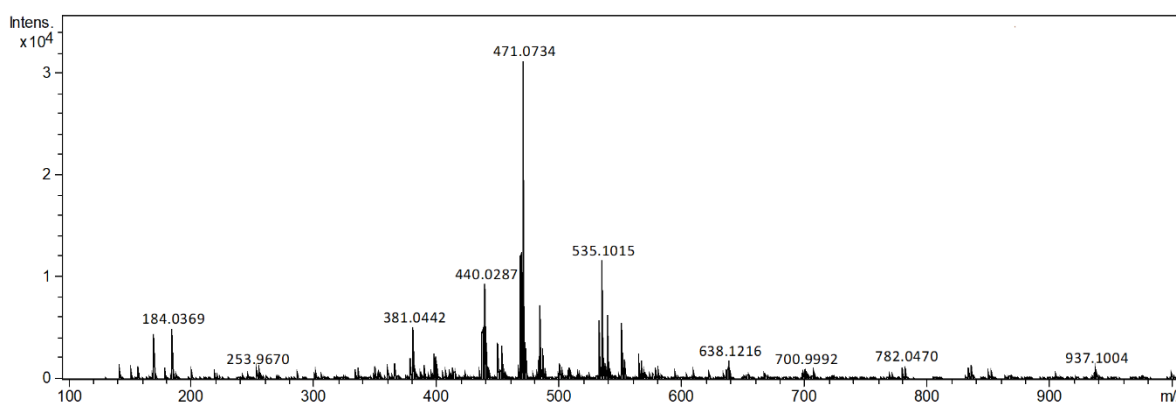
FIGURA 4.26. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$, em preto e do produto final da síntese, em vermelho.



Estes resultados preliminares podem indicar duas situações: o ligante poderia estar se comportando como um ligante tetradentado e por meio do efeito quelato estar deslocando os dois ligantes cloretos e a bipyridina e então ocupando os quatro sítios de coordenação do ouro(III). Isto geraria um complexo em que as ligações estariam altamente tensionadas devido à própria conformação estrutural do ligante, mas possível, como há relatos na literatura de complexos similares, mas com metais de menor volume (Shalamzari, 2013; Fang, 2018). A outra situação possível seria o fracasso da bpy em estabilizar o centro metálico do ouro(III) e o ligante, via sua ligação C=S, estar reduzindo o ouro(III) a ouro(I), dessa forma também deslocando a bipyridina, já que o ouro(I) possui uma geometria linear incompatível com a bpy e o ligante estar se coordenando por meio de seus dois átomos mais macios de enxofre.

O espectro de massas traz informações que ajudam a solucionar algumas desta hipóteses (Figura 4.27). O pico base de razão $m/z = 471,0734$ não condiz com nenhuma provável estrutura, independente da carga que possua, que contenha bipyridina coordenada. Além disso, a razão $m/z = 422,9730$ responsável pelo íon $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]^+$ ou qualquer uma de suas fragmentações não existe em quantidade relevante.

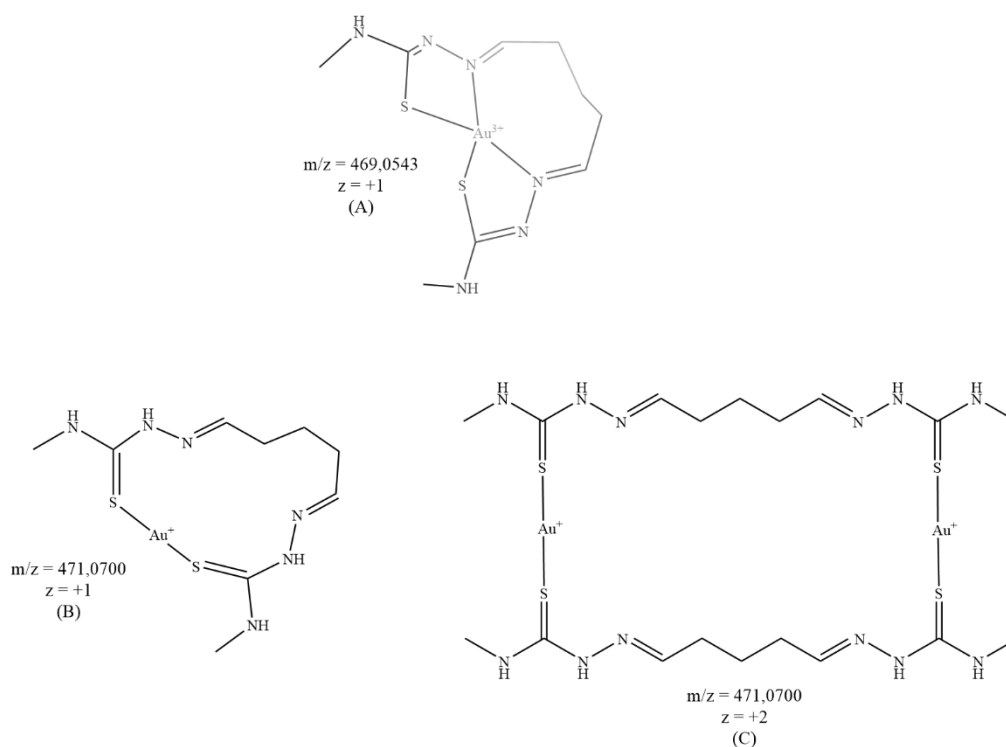
FIGURA 4.27. Espectro ESI(+)-MS do produto final da síntese dos complexos.



Analisando as possibilidades de estruturas moleculares anteriormente discutidas, chegamos em resultados conclusivos. A estrutura **(A)** da Figura 4.28, resultado da primeira hipótese discutida, não seria possível para a metodologia de síntese aplicada. Certamente o ligante carregaria duas cargas negativas, perdendo o próton da tioamida, como é o comportamento das tiossemicarbazonas observado em complexos de ouro(III) (Rettondin, 2016; Almeida, 2022; Bottenus, 2010; Maia, 2017). Disso, estaríamos tratando do complexo $[\text{Au}(\text{L}^1)]^+$ ou $[\text{Au}(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_6\text{S}_2)]^+$ e esta espécie possui uma razão $m/z = 469,0543$. Como a espectrometria de massas é uma técnica de análise muito precisa, não é possível assinalar o pico base sendo esta

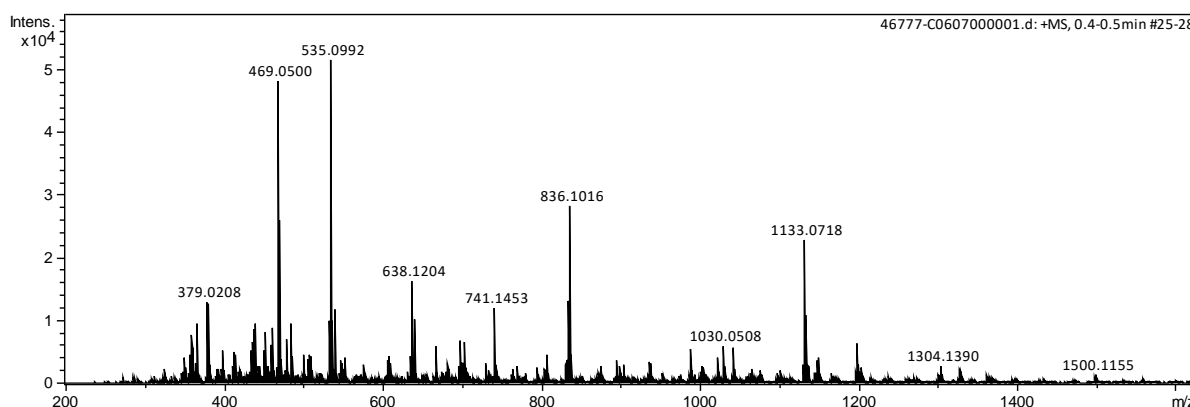
estrutura. Já as estruturas **(B)** e **(C)** são construídas a partir da ideia de formação dos complexos de ouro(I). Neste caso, as tiossemicarbazonas não apresentam a sua desprotonação característica do nitrogênio da tioamida e dados cristalográficos indicam que o comprimento da ligação da tiona é compatível com uma dupla ligação (Ameida, 2018; Oliveira, 2020; Lessa, 2012). O íon $[\text{Au}(\text{H}_2\text{L}^1)]^+$ representa a molécula **(B)** e possui uma razão $m/z = 471,0700$, um valor virtualmente igual ao expresso pelo pico base e também coincide com a proporção de 1:1 de metal:ligante utilizado na reação. Porém, o íon $[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{L}^1)_2]^{2+}$ que representa a molécula **(C)**, possui uma massa de 942,1400 e uma carga de +2, também possui uma razão $m/z = 471,0700$, também respeitando a proporção, embora reduzida, de 1:1 da síntese.

FIGURA 4.28. Representações das estruturas **(A)**, **(B)** e **(C)** de caráter hipotético para propor uma solução para o problema da síntese dos complexos de ouro de objetivo do trabalho.



Contudo, ao refazer esta síntese, mas mudando o tempo total de 1 hora para 5 minutos, observamos alguns dados diferentes. Um novo espectro de massas foi feito utilizando o produto da reação que durou 5 minutos, conforme a Figura 4.29, e podemos perceber a prevalência de dois picos mais abundantes, de $m/z = 535$, também presente no gráfico da figura 4.27, e o pico $m/z = 469,05$ este último condizente com a estrutura **(A)**.

FIGURAL 4.29. Espectro ESI(+)-MS do produto da reação de 5 minutos.



Existem outros picos presentes neste espectro que indicam a formação de outras estruturas de compostos de coordenação de variadas proporções entre o ouro e o ligante, porém não convém trata-las com atenção especial. Isso porque os dados comparados entre as sínteses sugerem um leve balanço entre a formação de um provável produto cinético e termodinâmico, além da falta de controle de subprodutos, causada principalmente pelo fato do ligante H_2L^1 , e em consequência o H_2L^2 , possuírem uma grande cadeia carbônica entre seus grupos coordenantes acarretando num perfil variado de comportamento do ligante. Porém, existem dois trabalhos registrados na literatura que podem indicar uma conformação preferida para o produto final buscado neste trabalho. Lessa e colaboradores fizeram a síntese de um ligante tiossemicarbazona semelhante ao deste trabalho, porém utilizando o glioxal como a fonte de carbonila (Lessa, 2012). No trabalho do autor, é chegada à conclusão da formação do complexo de ouro (I) semelhante a estrutura (C). Já Constable e colaboradores sintetizaram um complexo de paládio (II) com um ligante derivado do glutaraldeído, porém formando uma outra base de Schiff, uma hidrazona (Constable, 1979). Seu trabalho também traz dados cristalográficos do complexo e sua estrutura é, também, semelhante a hipótese (C). Até o presente momento de depósito desta dissertação, não foi possível apresentar dados que comprovem veementemente a formação dos complexos e novos experimentos estão sendo conduzidos para melhorar a metodologia de síntese e caracterizar os complexos de ouro derivados dos novos ligantes H_2L^1 e H_2L^2 .

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos objetivos propostos e os resultados obtidos até o presente momento para esta Dissertação de Mestrado foi possível a síntese, caracterização estrutural e biológica dos novos compostos pentano-1,5-diilidenobis(*N*-metilhidrazina-1-carbotioamida) H_2L^1 e pentano-1,5-diilidenobis(*N*-benzilhidrazina-1-carbotioamida) H_2L^2 . Ambos compostos foram caracterizados por meio de técnicas espectroscópicas como o infravermelho, absorção no ultravioleta-visível, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, análise elementar, temperatura de fusão e espectrometria de massas, sendo possível identificar a presença dos grupos funcionais esperados, bem como a formação do tautômero tiona dessas tiossemicarbazonas. Ensaio de viabilidade celular contra as linhagens tumorais HeLa (câncer de colo do útero) e HepG2 (câncer de fígado humano) foram realizados utilizando estas novas moléculas como tratamento. H_2L^1 apresentou uma citotoxicidade maior que H_2L^2 contra os dois tipos células, com destaque para seu IC_{50} na casa das unidades e dezenas de concentração micromolar.

Diversas tentativas foram feitas para realizar a síntese e caracterização dos complexos de ouro derivados das novas tiossemicarbazonas, e os dados gerados indicam um espaço para aperfeiçoamento da metodologia e continuação das sínteses e caracterizações, que são possíveis.

As perspectivas futuras deste trabalho consistem na continuação e aprimoramento das etapas ainda não solucionadas, assim como a obtenção de dados mais finos de caracterizações já feitas e dos testes biológicos. Disso:

- Novos experimentos estão sendo programados para a viabilidade da formação dos compostos de coordenação com ouro, de forma a caracterizar e submetê-los a ensaios de atividade citotóxica contra tumores. Apesar de H_2L^2 não demonstrar citotoxicidade relevante, seu complexo metálico poderá apresentar alguma atividade;
- A realização de experimentos *in silico* obtendo dados sobre lipofilicidade (logP) e solubilidade dos dois novos compostos e investigar se esta pode ser uma das razões observadas nas diferentes citotoxicidades;
- Investigar a interação entre íons de Fe^{II} e Fe^{III} com H_2L^1 por meio de técnicas espectroscópicas;
- Avaliar a capacidade de formação de espécies reativas de oxigênio de complexos de ferro com as novas tiossemicarbazonas em estudos de atividade antioxidante dependente de ferro;

- H_2L^1 , por apresentar citotoxicidade, foi eleita para ser usada em testes de inibição da enzima Ribonucleotídeo Redutase (RR), alvo terapêutico comum das tiossemicarbazonas. Os testes serão realizados no Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em colaboração com a pós-doutoranda Dra. Tatiana Araujo Pereira.

6. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Von Hans-Norbert; STRAHLE, Joachim. Darstellung und Struktur von [Hpy][AuCl₄], AuCl₃·py, [AuCl₂(py)₂]Cl·H₂O und [AuCl₂(py)₂][AuCl₂]. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, v. 485, p. 65–80, 1982.
- ALMEIDA, Carolane M.; MARCON, Pedro H.; NASCIMENTO, Érica C.M.; et al. Organometallic gold (III) and platinum (II) complexes with thiosemicarbazone: Structural behavior, anticancer activity, and molecular docking. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 36, n. 8, p. 1–15, 2022.
- ALMEIDA, Carolane M.; NASCIMENTO, Gabriel P.; MAGALHÃES, Kelly G.; et al. Crystal structures, DNA-binding ability and influence on cellular viability of gold(I) complexes of thiosemicarbazones. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 71, n. 4, p. 502–519, 2018.
- ANGELUCCI, Francesco; SAYED, Ahmed A.; WILLIAMS, David L.; et al. Inhibition of schistosoma mansoni thioredoxin-glutathione reductase by Auranofin. Structural and kinetic aspects. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 42, p. 28977–28985, 2009.
- ANTHONY, Elizabeth J.; BOLITHO, Elizabeth M.; BRIDGEWATER, Hannah E.; et al. Metallo-drugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science*, v. 11, n. 48, p. 12888–12917, 2020.
- BARD, A. J.; Parsons, B.; Jordon, J., eds. *Standard Potentials in Aqueous Solutions*, Dekker: New York, 1985.
- BECIT, Merve; AYDIN DILSIZ, Sevtap; BAŞARAN, Nurşen. Interaction of curcumin on cisplatin cytotoxicity in HeLa and HepG2 carcinoma cells. *Istanbul Journal of Pharmacy*, v. 50, n. 3, p. 202–210, 2020.
- BELLOTTI, Denise; REMELLI, Maurizio. Deferoxamine b: A natural, excellent and versatile metal chelator. *Molecules*, v. 26, n. 11, p. 1–21, 2021.
- BERALDO, Heloisa; GAMBINO, Dinorah. The Wide Pharmacological Versatility of Semi-carbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 31–39, 2005.
- BOOTH, Barbara A.; MOORE, E. Colleen; SARTORELLI, Alan C. Metabolic Effects of Some Tumor-inhibitory Pyridine Carboxaldehyde Thiosemicarbazones. *Cancer Research*, v. 31, n. 3, p. 228–234, 1971.
- BOOTH, Barbara A.; SARTORELLI, Alan C. Metabolic effects of copper in intact cells: comparative activity of cupric chloride and the cupric chelate of kethoxal bis(thiosemicarbazone). *Molecular Pharmacology*, 3, 290–302, 1967.
- BOTTENUS, Brienne N.; KAN, Para; JENKINS, Tyler; et al. Gold(III) bis-thiosemicarbazonato complexes: synthesis, characterization, radiochemistry and X-ray crystal structure analysis. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 37, n. 1, p. 41–49, 2010.
- CARVALHO, Rodrigo R.V.; PERES, Tanara V.; LIRIA, Cleber W.; et al. Conjugates of desferrioxamine and aromatic amines improve markers of iron-dependent neurotoxicity. *BioMetals*, v. 34, n. 2, p. 259–275, 2021.
- CASINI, Angela; DIAWARA, Mariam Celine; SCOPELLITI, Rosario; et al. Synthesis, characterisation and biological properties of gold(III) compounds with modified bipyridine and

bipyridylamine ligands. *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions*, v. 39, n. 9, p. 2239–2245, 2010.

CINELLU, Maria Agostina; MINGHETTI, Giovanni; PINNA, Maria Vittoria; *et al.* Gold(III) derivatives with anionic oxygen ligands: mononuclear hydroxo, alkoxo and acetato complexes. Crystal structure of [Au(bpy)(OMe)₂][PF₆]. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, n. 8, p. 1261–1265, 2000.

CONSTABLE, Anthony G; MCDONALD, Walter S; SHAW, Bernard L; *et al.* Preparation and Crystal Structure of the Sixteen-atom Ring Complex Di- μ -[glutaraldehyde bis(dimethylhydrazine)]-bis[dichloropalladium(II)]. *Dalton Transactions*, p. 1109–1111, 1979.

CRIADO, J. J.; LOPEZ-ARIAS, J. A.; MACIAS, B.; *et al.* Au(III) Complexes of Tris-Dithiocarbamate Derivatives of α -Amino Acids: Spectroscopic Studies, Thermal Behavior and Antibacterial Activity. *Inorganica Chimica Acta*, v. 193, p. 229-235, 1992.

DA SILVA, Cleiton M.; DA SILVA, Daniel L.; MODOLO, Luzia V.; *et al.* Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2011

DA SILVA, João Bosco P.; NAVARRO, Daniela Maria Do A.F.; DA SILVA, Aluizio G.; *et al.* Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 100, p. 162–175, 2015.

DE LIRA-QUEZADA, Cindy E.; VILLARREAL-GONZALEZ, Rosalaura V.; GONZALEZ-DIAZ, Sandra N.; *et al.* Successful oxaliplatin desensitization protocol in a patient with colorectal metastatic cancer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, v. 27, n. 2, p. 490–493, 2021.

DE MARTEL, Catherine; GEORGES, Damien; BRAY, Freddie; *et al.* Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020.

DE PAIVA, Raphael E.F.; MARÇAL NETO, Antônio; SANTOS, Igor A.; *et al.* What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks. *Dalton Transactions*, v. 49, n. 45, p. 16004–16033, 2020.

DOMAGK, G., BEHNISCH, R., MIETZSCH, F.; *et al.* New compound active against *Tuberculosis bacilli in vitro*. *Naturwissenschaften* 33, 315, 1946.

DRAGO, Russel S. *Physical Methods for chemists*, 2nd Edition. United States of America. Surfside Scientific Publishers, 1992.

FANG, Duo Wen; JIA, Ai Quan; DONG, Xian Ping; *et al.* Syntheses, characterization and reactivity of dinuclear ruthenium-nickel complexes with hexane-2,5-dione bis(thiosemicarbazono) ligands. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 871, p. 122–129, 2018.

FARREL, N.P.; *Use of Inorganic Chemistry in Medicine*; Cambridge, Reino Unido; The Royal Chemical Society, 1999.

FINCH, Rick A.; LIU, Mao Chin; GRILL, Susan P.; *et al.* Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, n. 8, p. 983–991, 2000.

GABBIANI, Chiara; CASINI, Angela; MESSORI, Luigi. Gold(III) compounds as anticancer drugs. *Gold Bulletin*, v. 40, n. 1, p. 73–81, 2007.

GHOSH, Sumit. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, v. 88, n. October 2018, p. 102925, 2019.

GOSWAMI, Dibakar; MACHINI, M. Teresa; SILVESTRE, Daniel M.; *et al.* Cell penetrating peptide (CPP)-conjugated desferrioxamine for enhanced neuroprotection: Synthesis and in vitro evaluation. *Bioconjugate Chemistry*, v. 25, n. 11, p. 2067–2080, 2014.

GUPTA, Sakshi; SINGH, Nidhi; KHAN, Tahmeena; *et al.* Thiosemicarbazone derivatives of transition metals as multi-target drugs: A review. *Results in Chemistry*, v. 4, n. May, p. 100459, 2022.

HILL, D.T., SUTTON, B.M.; *Crystal Structure Communications*, 9, 679, 1980.

HU, Wei Xiao; ZHOU, Wei; XIA, Chun Nian; *et al.* Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 8, p. 2213–2218, 2006.

HUAYHUAZ, Jesus Antonio Alvarado; VITORINO, Hector Aguilar; CAMPOS, Othon Souto; *et al.* Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 41, p. 16–22, 2017.

INCA, 2022. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro. 2022

KALINOWSKI, Danuta S; QUACH, Patricia. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. *Future Medicinal Chemistry*, v. 1, n. 6, p. 1143-1151, 2009.

KHOURY, Aleen; DEO, Krishant M.; ALDRICH-WRIGHT, Janice R. Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 207, n. March, p. 111070, 2020.

KIM, Jong Hyun; REEDER, Evan; PARKIN, Sean; *et al.* Gold(I/III)-Phosphine Complexes as Potent Antiproliferative Agents. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.

KOLBERG, Matthias; STRAND, Kari R; GRAFF, Pål; *et al.* Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1699, n. 1–2, p. 1–34, 2004.

LAPLANTINE, Emmanuel; CHABLE-BESSIA, Christine; OUDIN, Anne; *et al.* The FDA-approved drug Auranofin has a dual inhibitory effect on SARS-CoV-2 entry and NF- κ B signaling. *iScience*, v. 25, n. 10, 2022.

LEE, Goeun; YANG, Eunhee; KIM, Sojin; *et al.* Parapheromones suppress chemotherapy side effects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 367, n. 2, p. 215–221, 2018.

LEIJEN, Suzanne; BURGERS, Sjaak A.; BAAS, Paul; *et al.* Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Investigational New Drugs*, v. 33, n. 1, p. 201–214, 2015.

LESSA, Josane A.; FERRAZ, Karina S O; GUERRA, Juliana C.; *et al.* Spectroscopic and electrochemical characterization of gold(I) and gold(III) complexes with glyoxaldehyde bis(thiosemicarbazones): Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *BioMetals*, v. 25, n. 3, p. 587–598, 2012.

LI, Bin; ESPÓSITO, Breno Pannia; WANG, Shunhao; *et al.* Desferrioxamine-caffeine shows improved efficacy in chelating iron and depleting cancer stem cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 52, n. January, p. 232–238, 2019.

LU, Yunlong; MA, Xiaoyan; CHANG, Xingyu; *et al.* Recent development of gold(i) and gold(iii) complexes as therapeutic agents for cancer diseases. *Chemical Society Reviews*, v. 51, n. 13, p. 5518–5556, 2022.

MAIA, P. I.D.S.; CARNEIRO, Z. A.; LOPES, C. D.; *et al.* Organometallic gold(iii) complexes with hybrid SNS-donating thiosemicarbazone ligands: cytotoxicity and anti-Trypanosoma cruzi activity. *Dalton Transactions*, v. 46, n. 8, p. 2559–2571, 2017.

MAKOVEC, Tomaz. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, v. 53, n. 2, p. 148–158, 2019.

MEDICI, Serenella; PEANA, Massimiliano; NURCHI, Valeria Marina; *et al.* Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 284, p. 329–350, 2015.

MIGNEAULT, Isabelle; DARTIGUENAVE, Catherine; BERTRAND, Michel J.; *et al.* Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MILAZZO, G.; Caroli, S.; Sharma, V. K. *Tables of Standard Electrode Potentials*, Wiley: London, 1978

MOORE, E. Colleen; BOOTH, Barbara A.; SARTORELLI, Alan C. Inhibition of Deoxyribonucleotide Synthesis by Pyridine Carboxaldehyde Thiosemicarbazones. *Cancer Research*, v. 31, n. 3, p. 235–238, 1971.

OLELEWE, Chibuzor; KIM, Jong Hyun; OFORI, Samuel; *et al.* Gold(III)-P-chirogenic complex induces mitochondrial dysfunction in triple-negative breast cancer. *iScience*, v. 25, n. 5, p. 104340, 2022.

OLIVEIRA, Ana P.A.; FREITAS, Jennifer T.J.; DINIZ, Renata; *et al.* Triethylphosphinegold(I) Complexes with Secnidazole-Derived Thiosemicarbazones: Cytotoxic Activity against HCT-116 Colorectal Cancer Cells under Hypoxia Conditions. *ACS Omega*, n. I, 2020.

PAVAN, Fernando R.; MAIA, Pedro I.da S.; LEITE, Sergio R.A.; *et al.* Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, 2010.

PAVIA, Donald. L.; LAMPMAN, Gary. M.; KRIZ, George. S. *Introduction do Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*; 3rd Edition, United States of America; Thomson Learning, 2001.

RAO, V. Ashutosh; KLEIN, Sarah R.; AGAMA, Keli K.; *et al.* The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase IIA in breast cancer cells. *Cancer Research*, v. 69, n. 3, p. 948–957, 2009.

RETTONDIN, Andressa R.; CARNEIRO, Zumira A.; GONÇALVES, Ana C.R.; *et al.* Gold(III) complexes with ONS -Tridentate thiosemicarbazones: Toward selective trypanocidal drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 120, p. 217–226, 2016.

- RISS, Terry L; MORAVEC, Richard A; NILES, Andrew L; *et al.* Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual, n. Md, p. 1–25, 2004.
- RODER, Christine; THOMSON, Melanie J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs in R and D*, v. 15, n. 1, p. 13–20, 2015.
- RONCONI, Luca; GIOVAGNINI, Lorena; MARZANO, Christine; *et al.* Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: Design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorganic Chemistry*, v. 44, n. 6, p. 1867–1881, 2005.
- ROSENBERG, Barnett; VANCAMP, Loretta; KRIGAS. *Nature*, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965
- SANTIAGO, Pedro H. O.; FUJIMORI, Mahmi; CHAGAS, Marcio A. S.; *et al.* Two Cu(I) complexes based on semicarbazone ligand: synthesis, crystal structure, Hirshfeld surface and anti-cancer activity evaluation against human cell lines. *Structural Chemistry*, n. I, 2019.
- SCHWARTZ, Jennifer A.; LIUM, Erik K.; SILVERSTEIN, Saul J. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry Is Inhibited by the Cobalt Chelate Complex CTC-96. *Journal of Virology*, v. 75, n. 9, p. 4117–4128, 2001.
- SHALAMZARI, Mohammad Safi; GURBANOV, Atash V.; HEIDIC, Seykens; *et al.* [Hexane-2,5-dione bis(thiosemicarbazonato)]nickel(II). *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, v. 69, n. 6, 2013.
- SHAO, Jimin; ZHOU, Bingsen; DI BILIO, Angel J.; *et al.* A ferrous-triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 3, p. 586–592, 2006.
- SIUZDAK, Gary. *Mass Spectrometry for Biotechnology*. United States of America; Academic Press, 1996.
- SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- SWIFT, E. H.; Butler, E. A. *Quantitative Measurements and Chemical Equilibria*, Freeman: New York, 1972.
- THE ASCO POST. Cancer Drugs Account for Over a Quarter of All New Drug Approvals in the US. *The ASCO Post*, 2019. Disponível em: <https://ascopost.com/news/september-2019/cancer-drugs-account-for-over-a-quarter-of-all-new-drug-approvals-in-the-us/> (Acessado em julho de 2023).
- TIAN, Songhai; SIU, Fung Ming; LOK, Chun Nam; *et al.* Anticancer auranofin engages 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) as a target. *Metallomics*, v. 11, n. 11, p. 1925–1936, 2019.
- TRONDL, Robert; HEFFETER, Petra; KOWOL, Christian R.; *et al.* NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chemical Science*, v. 5, n. 8, p. 2925–2932, 2014.
- WANG, Wei; ARSHAD, Muhammad Imran; KHURSHID, Mohsin; *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, p. 1645–1658, 2018.
- WHITNALL, Megan; HOWARD, Jonathan; PONKA, Prem; *et al.* A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to

chemotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 40, p. 14901–14906, 2006.

WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Acessado em julho de 2023).

WILES, D. M.; GINGRAS, B. A.; SUPRUNCHUK, T. The C=S stretching vibration in the infrared spectra of some thiosemicarbazones. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 469–473, 1967.

YUAN, Jun; LOVEJOY, David B.; RICHARDSON, Des R. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: In vitro and in vivo assessment. *Blood*, v. 104, n. 5, p. 1450–1458, 2004.

ZHANG, Gengwei; ZHOU, Yang; DING, Zhao; *et al.* Nanosilica-supported thiosemicarbazide-glutaraldehyde polymer for selective Au(III) removal from aqueous solution. *RSC Advances*, v. 7, n. 87, p. 55215–55223, 2017.

7. APÊNDICES

APÊNDICE I: Imagens espectroscópicas obtidas a partir de análises de ressonância magnética nuclear de ^1H .

Figura A.1. Espectro de RMN de ^1H do produto da síntese entre o sal $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$ e H_2L^1 .

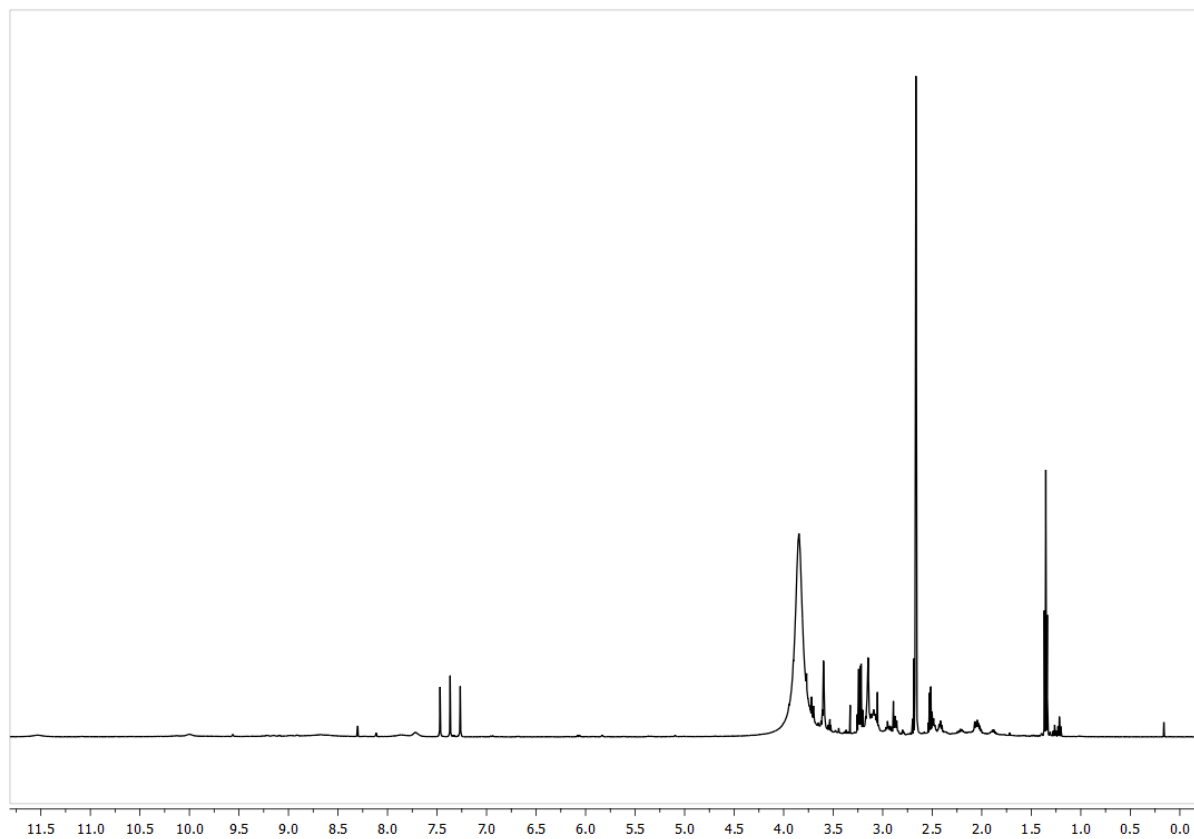
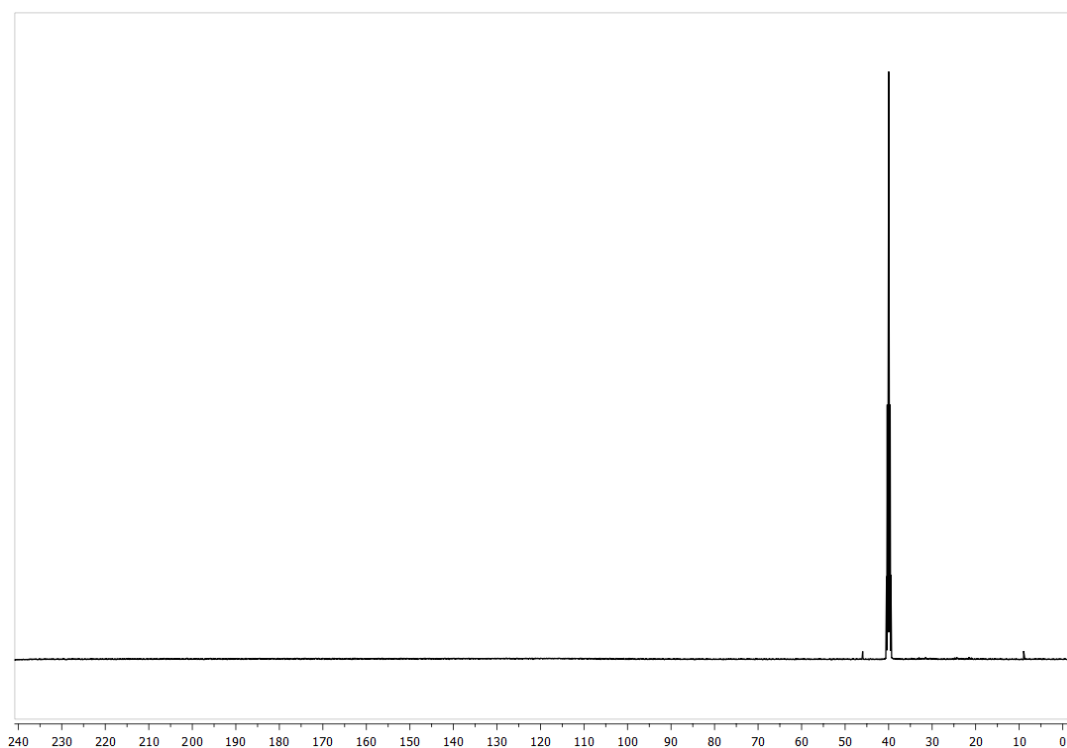


Figura A.2. Espectro de RMN de ^{13}C do produto da síntese entre o sal $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$ e H_2L^1 .



APÊNDICE II: Imagens dos espectros obtidos a partir de análises de espectrometria de massas.

Figura A.3. Espectro ESI(+)-MS para $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$.

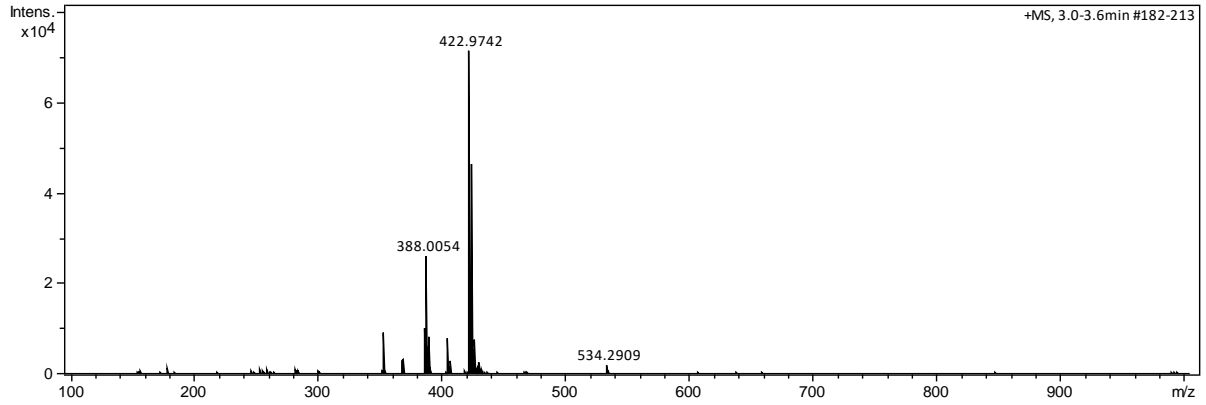


Figura A.4. Espectro ESI(+)-MS do produto da síntese entre o sal $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$ e H_2L^1 .

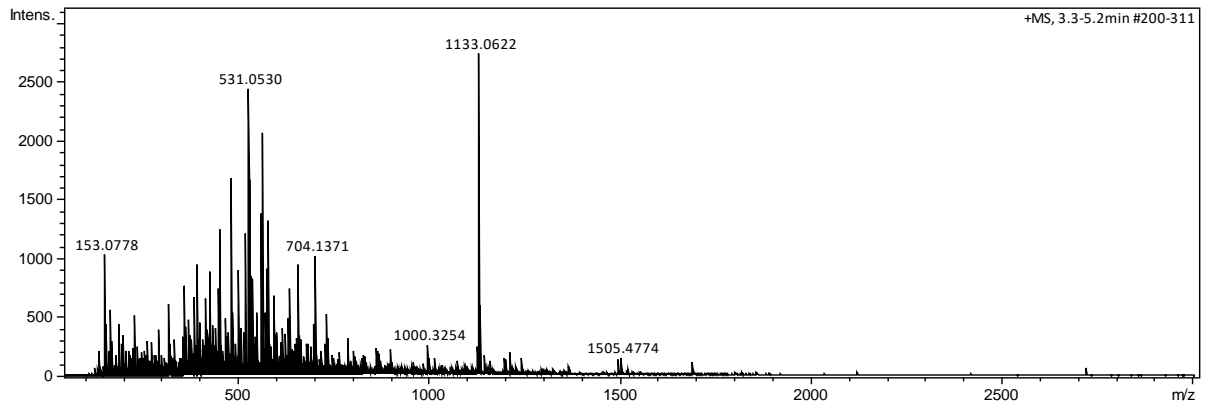


Figura A.5. Espectro ESI(+)-MS do produto da síntese entre o sal $[\text{Hpy}][\text{AuCl}_4]$ e H_2L^2 .

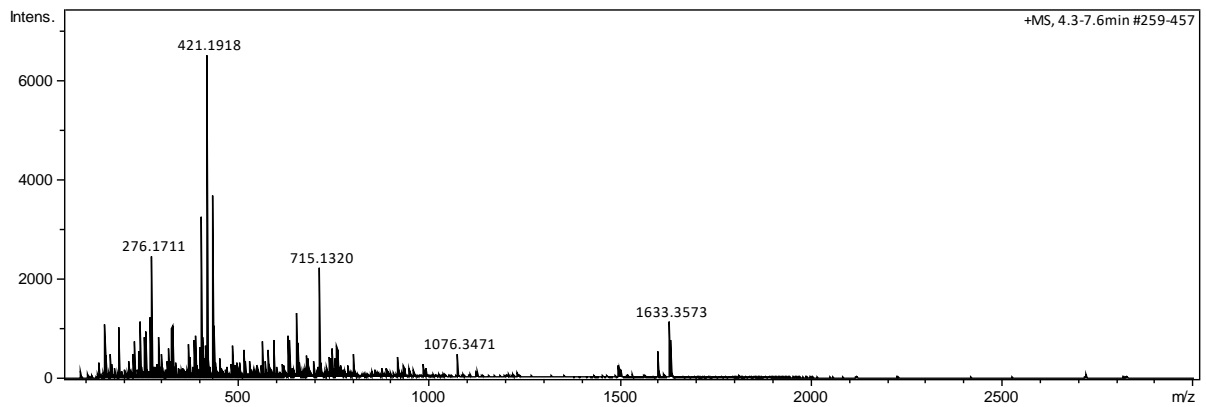
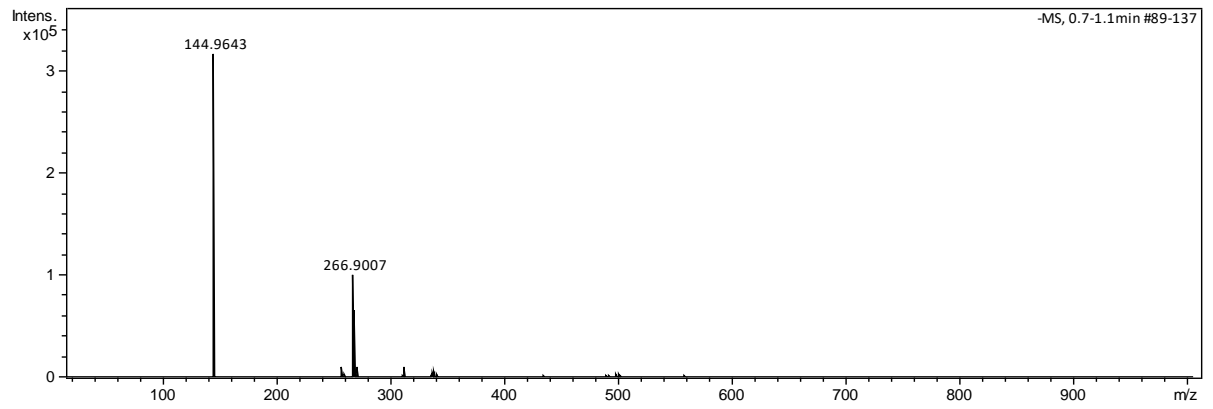


Figura A.6. Espectro de ESI(-)MS para $[\text{Au}(\text{bpy})\text{Cl}_2]\text{PF}_6$.

APÊNDICE III. Tabelas dos valores obtidos a partir de análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

Tabela A.1. Análise elementar do produto da síntese entre o sal [Hpy][AuCl₄] e H₂L¹.

Análise Elementar		
Teórico	Experimental	 \Delta
C: 13,38 %	C: 11,12 %	C: 2,26 %
H: 2,00 %	H: 3,09 %	H: 1,09 %
N: 10,4 %	N: 6,82 %	N: 3,58 %

Tabela A.2. Análise elementar do produto da síntese entre o sal [Hpy][AuCl₄] e H₂L².

Análise Elementar		
Teórico	Experimental	 \Delta
C: 26,27 %	C: 28,46 %	C: 2,19 %
H: 2,52 %	H: 2,87 %	H: 0,35 %
N: 8,75 %	N: 8,22 %	N: 0,53 %

APÊNDICE IV. Espectros UV-Vis.

Figura A.7. Espectro na região do ultravioleta de H_2L^1 obtido de uma dissolução seriada. O solvente utilizado foi o DMSO e as concentração variam de 10,72 mM até 0,010 mM.

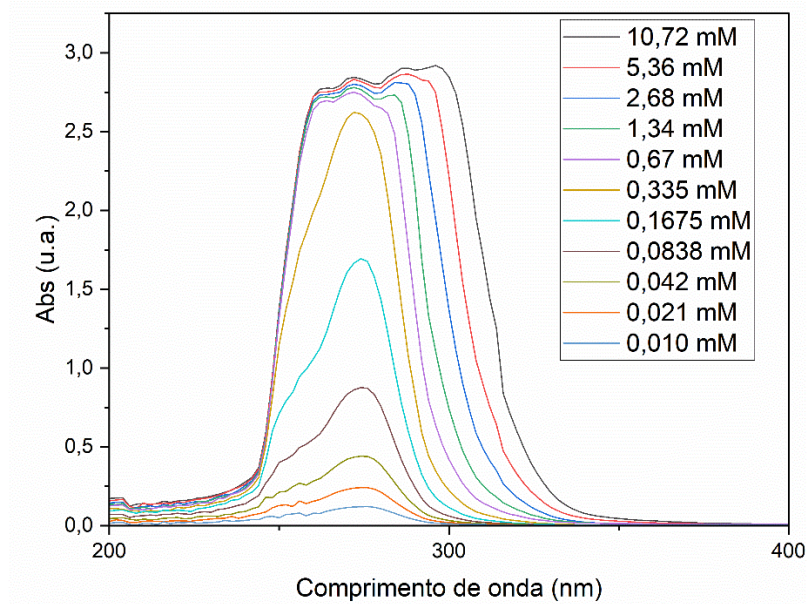


Figura A.7. Espectro na região do ultravioleta de H_2L^2 obtido de uma dissolução seriada. O solvente utilizado foi o DMSO e as concentração variam de 10,72 mM até 0,010 mM.

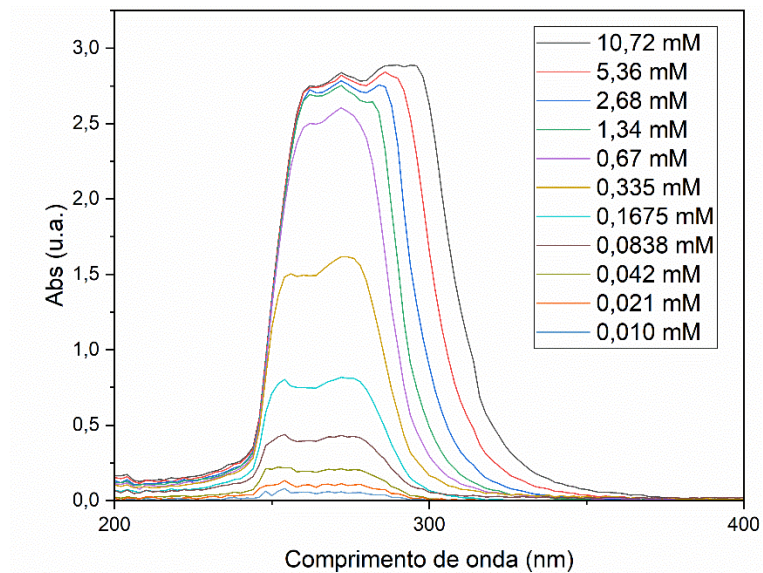


Figura A.8. Espectro de UV-Vis utilizado para obter os dados para o método Job's Plot para H_2L^1 e ouro(III).

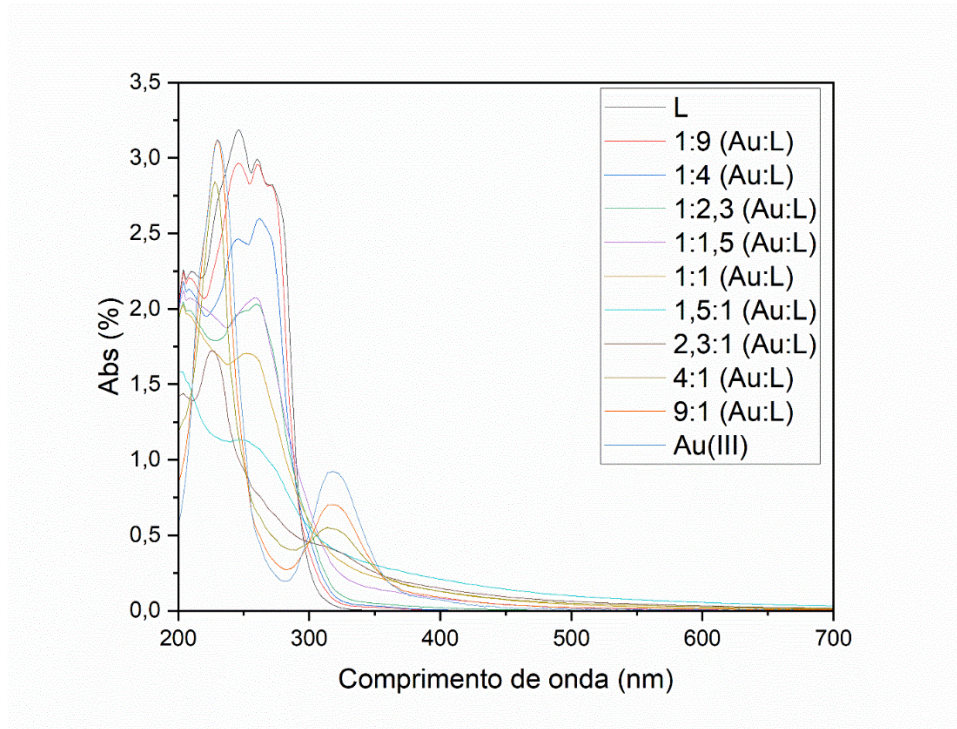
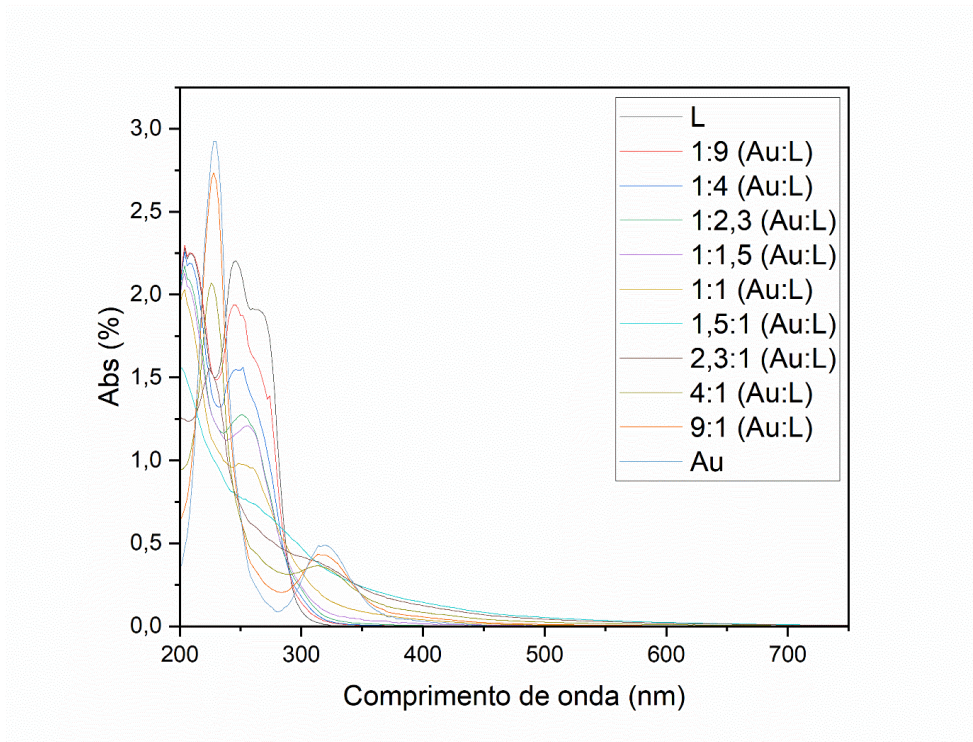


Figura A.9. Espectro de UV-Vis utilizado para obter os dados para o método Job's Plot para H_2L^2 e ouro(III).



APÊNDICE V. Ajuste de curva não-linear por um modelo dose-resposta utilizando o programa Origin 2022 para obter o valor de IC_{50} para os compostos H_2L^1 e H_2L^2 .

Figura A.10. IC_{50} obtido do ajuste dos dados de viabilidade de H_2L^1 contra HeLa, aproximadamente $7,74 \mu M$.

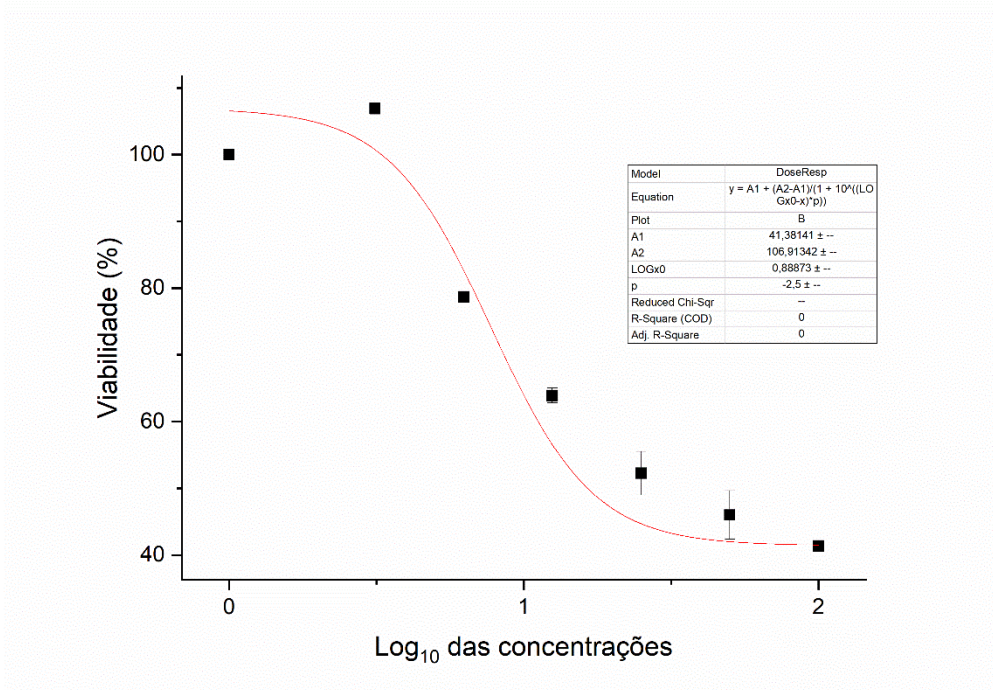


Figura A.11. IC_{50} obtido do ajuste dos dados de viabilidade de H_2L^1 contra HepG2, aproximadamente $32,40 \pm 8,96 \mu M$.

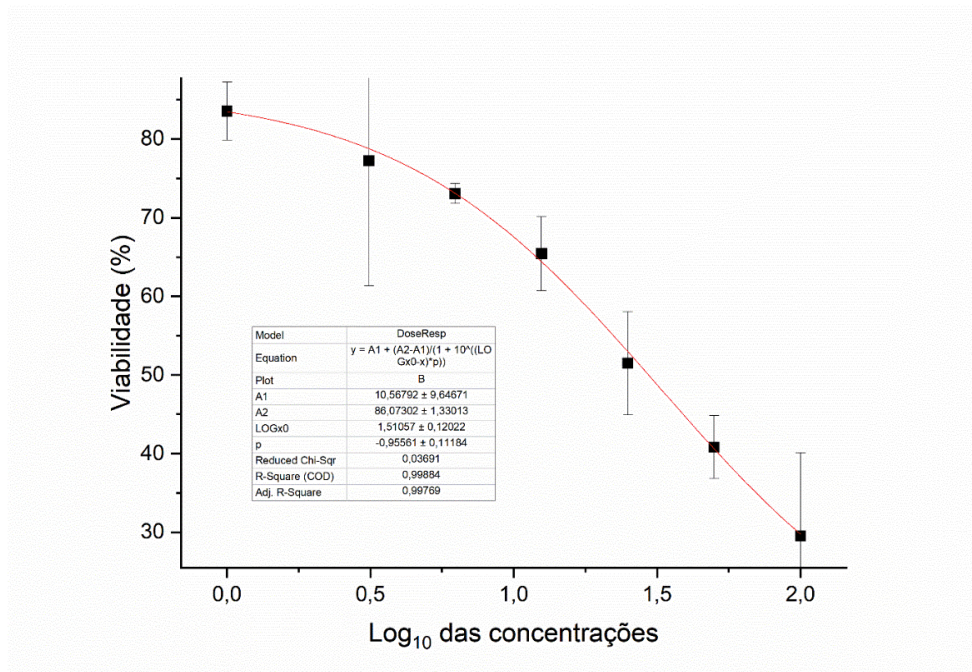


Figura A.12. Gráfico dos valores de viabilidade celular contra o \log_{10} das concentrações usadas no ensaio de H_2L^2 contra HeLa. Não foi realizado o ajuste da curva dose-resposta.

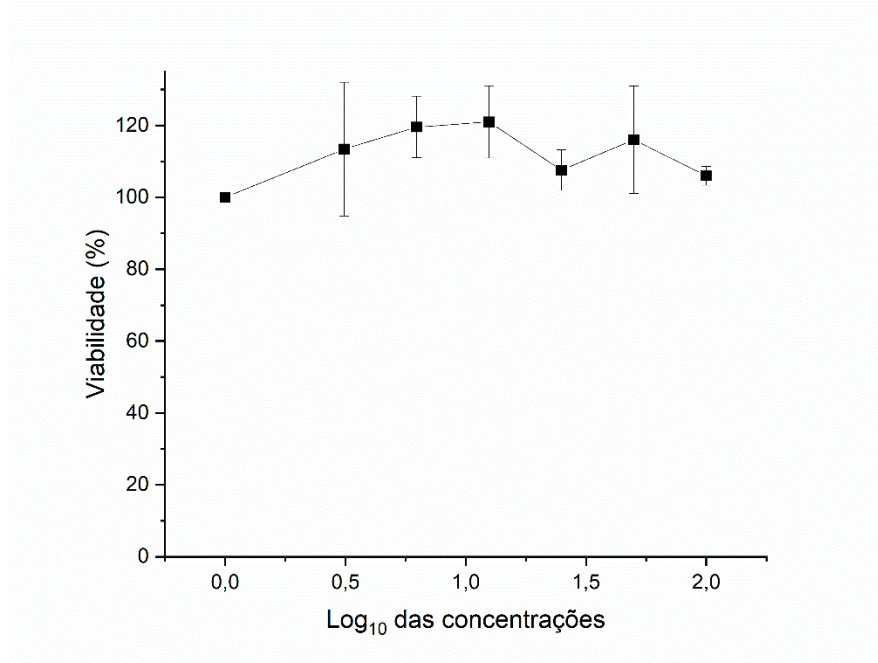
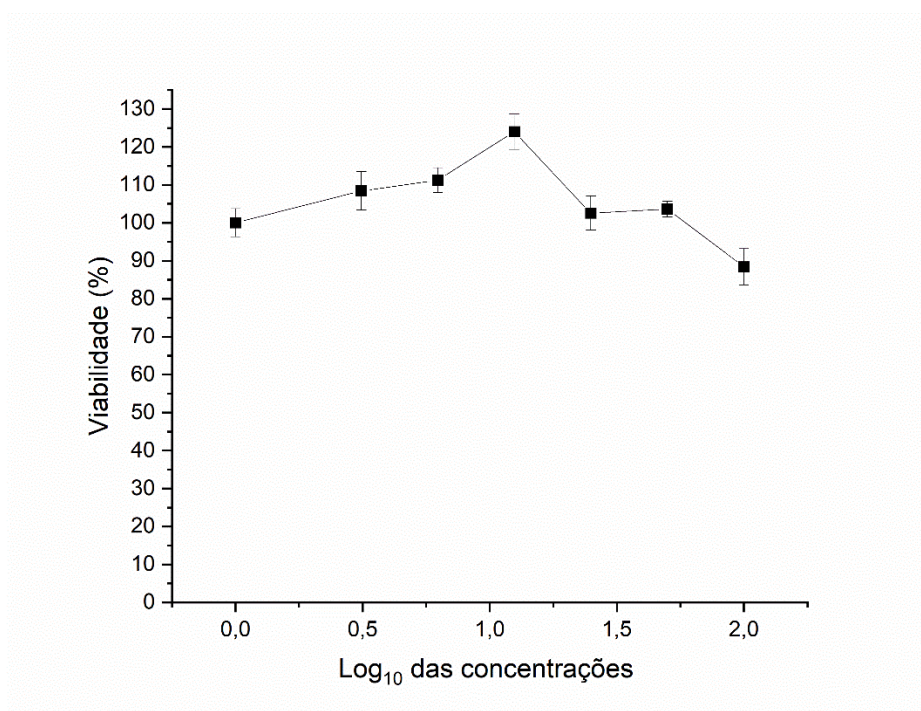


Figura A.13. Gráfico dos valores de viabilidade celular contra o \log_{10} das concentrações usadas no ensaio de H_2L^2 contra HepG2. Não foi realizado o ajuste da curva dose-resposta.



SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Pedro Henrique Salgado Marcon

Data de Nascimento: 13/04/1998

E-mail: pedromrcon@gmail.com

CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4844453184921649>

2. FORMAÇÃO

- 2016-2021: Graduação em Química (Bacharelado) – Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brasil.

- Bolsista voluntário de iniciação científica (08/2018 a 08/2019). Plano de trabalho: Síntese e avaliação estrutural de novos complexos de ouro(III) com ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas.

- Bolsista CNPq de iniciação científica (08/2019 a 08/2020). Plano de trabalho: Síntese e avaliação estrutural de novos complexos de ouro(III) com ligantes ditiocarbazatos NNS-tridentados.

- Trabalho de conclusão de curso: Síntese e avaliação estrutural de um novo ligante bis(ditiocarbazato) e seu complexo de ouro(III).

3. OCUPAÇÃO

Bolsista CNPq (08/2021 a 07/2023) de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química do IQUSP.

4. PUBLICAÇÕES

ALMEIDA, Carolane M.; **MARCON, Pedro H.**; NASCIMENTO, Érica C.M.; et al. Organometallic gold(III) and platinum(II) complexes with thiosemicarbazone: Structural behavior, anticancer activity, and molecular docking. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 36, n. 8, p. 1–15, 2022.