



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO CRISTALOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE DERIVADOS DAS VITA-
MINAS B₆ E K₃ E SEUS COMPLEXOS DE COBRE(II)**

DOUTORANDO: MARCIO ADRIANO SOUSA CHAGAS
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CLAUDIA CRISTINA GATTO

BRASÍLIA – DF, BRASIL

2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO CRISTALOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE DERIVADOS DAS VITA-
MINAS B₆ E K₃ E SEUS COMPLEXOS DE COBRE(II)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, na área de concentração de Química Inorgânica, da Universidade de Brasília (DF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **DOUTOR EM QUÍMICA**.

MARCIO ADRIANO SOUSA CHAGAS

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CLAUDIA CRISTINA GATTO

BRASÍLIA – DF, BRASIL

2019

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Marcio Adriano Sousa Chagas**, matrícula nº **15/0103042**, intitulada “**Estudo Cristalográfico e Biológico de Derivados das Vitaminas B6 e K3 e seus Complexos de Cobre(II)**”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 5 de agosto de 2019.

Prof.^a Dra. Claudia Cristina Gatto
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Lincoln Lucilio Romualdo
Membro Titular (UFG)

Prof. Dr. José Alves Dias
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Marcello Moreira Santos
Membro Titular (IQ/UnB)

Dr. Rudy Crisafulli
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 5 de agosto de 2019.

Aos meus pais Adriana e Claudio por todo carinho e educação que me deram.

À minha irmã Ana Beatriz pela amizade, e torcida pelo meu sucesso.

Aos meus familiares pela preocupação, apoio e carinho.

À minha querida Marla, por toda torcida, companheirismo e amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Claudia Cristina Gatto, pelo suporte e confiança depositados tanto na elaboração deste trabalho quanto nos desafios encontrados na rotina diária do laboratório.

Aos colegas do LASIC, em especial Iariane, Carolane, Pedro, Gabi, Cássia e Franciele que me receberam com todo carinho, proporcionando momentos de descontração e estudo durante o convívio.

Aos professores do IQ/UnB, que contribuíram para minha formação profissional e acadêmica dos quais participei das disciplinas e seminários.

À Prof^a Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, Hugo Dellon e os colaboradores do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás que contribuíram para a execução do trabalho.

Aos técnicos e coordenadores da Central Analítica do IQ-UnB (CAIQ), que contribuíram para a realização das análises necessárias.

Ao Prof. Dr. Eduardo Luzia França e Prof^a. Dr^a. Adenilda Cristina Honório França, além de todos os colegas do Laboratório de Imunomodulação e Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal de Mato Grosso em Barra do Garças, que contribuíram para as análises biológicas do trabalho.

Ao casal Alcântara e Maria e seus queridos filhos, que desde o início me deram todo o suporte para estar em Brasília e concluir este trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do distrito Federal FAPDF e à CAPES pela bolsa concedida e pelos projetos que permitem a aquisição de equipamentos e insumos indispensáveis para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho descreve a síntese, análise estrutural e espectroscópica de complexos inéditos de cobre(II) com ligantes polidentados derivados das vitamina B₆ e K₃, tendo como foco principal o desenvolvimento de compostos com atividade antitumoral. Através da obtenção de produtos cristalinos adequados para o método de difração de raios X de monocristal foram analisados, os ângulos e comprimentos de ligação, poliedros de coordenação, parâmetros de cela unitária, sistemas cristalinos e grupos espaciais. Foram elucidadas as estruturas de sete compostos, sendo eles, os complexos cloro-(piridoxal-alilodiotiocarbazato)-cobre(II) monohidratado - [Cu(HL¹)Cl]·H₂O (1), bromo(piridoxal-alilodiotiocarbazato)cobre(II) monohidratado - [Cu(HL¹)Br]·H₂O (2), cloro(piridoxal-feniltiosemicarbazona)cobre(II) - [Cu(HL²)Cl]·dmf (3), bromo(piridoxal-feniltiosemicarbazona)cobre(II) monohidratado - [Cu(HL²)Br]·H₂O·DMF (4), brometo de bromo(piridoxal-tiosemicarbazona)cobre(II) monohidratado [Cu(H₂L³)Br]Br·H₂O (5), além dos compostos menadiona-semicarbazona K₃tz e menadiona-isoniazida K₃iz. Nos complexos de cobre(II) os ligantes encontram-se tridentados, coordenando-se através dos átomos doadores oxigênio, nitrogênio e enxofre (ONS). Contudo, de acordo com as medidas dos ângulos de ligação, observa-se que os complexos de cobre(II) estão tetracoordenados e apresentam geometria quadrado planar distorcida. A citotoxicidade dos complexos metálicos para dois tipos de células cancerígenas (células Ehrlich e S-180) foram avaliadas por um ensaio colorimétrico com MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). O complexo (5) foi selecionado para estudar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à sua promissora citotoxicidade em células tumorais S-180 e Ehrlich, com IC₅₀ 33,30 (±0,06) e 16,89 (±1,02) respectivamente. Sendo assim, foram realizados os ensaios de para observar a via de morte celular por coloração dupla Hoechst 33342 / PI, e a análise de expressão gênica com RT-qPCR em ambas as células Ehrlich e S-180 expostas a 10 µM por 3 h, onde os resultados indicam que a morte celular ocorre por uma via programada, a apoptose, que causa danos menores ao organismo. A avaliação da atividade antitumoral dos compostos K₃sz e K₃iz também foi avaliada por teste de MTT em linhagens e células tumorais MCF-7 e em células mononucleares do sangue PBMC, sendo está indicada como célula normal para avaliação da seletividade dos compostos avaliados.

Palavras chave: Vitamina B₆, Vitamina K₃, Bases de Schiff, Cobre(II), Raios X.

ABSTRACT

The present study reports the synthesis and structural and spectroscopic analysis of a new copper (II) complexes with polydentate binders derived from B₆ and K₃ vitamin derivatives. The focus is the development of compounds with antitumor activity and to obtain crystalline products suitable for the monocrystal for DRX assay and thus evaluating the coordination modes presented by the metallic atom by obtaining suitable crystalline products for the X-ray diffraction method, the angles and bond lengths, coordinate polyhedra, unit cell parameters, crystalline systems and spatial groups were analyzed. The structure of seven compounds were studied. The Cu(II) complexes are, monohydrate pyridoxal *S*-allyldithiocarbazate copper (II) chloride [Cu(HL¹)Cl]·H₂O and monohydrate pyridoxal *S*-allyldithiocarbazate copper (II) bromide [Cu(HL¹)Br]·H₂O, pyridoxal *N*⁴-phenyl-3-thiosemicarbazone copper (II) chloride [Cu(HL²)Cl]·dmf, monohydrate pyridoxal *N*⁴-phenyl-3-thiosemicarbazone copper (II) bromide [Cu(HL²)Br]·H₂O·dmf and [Cu(H₂L³)Br]Br·H₂O, in addition to the menadione-semicarbazones K3tz and menadione-isoniazid compounds K3iz were also characterized by spectroscopic and physical-chemical analyses. The single-crystal X-ray study reveals that in all cases, the Schiff base coordinated tridentately through the ONS-donor atoms, resulting in distorted square planar coordination geometries with the copper atoms. The cytotoxicity of the complexes toward two kinds of cancerous cells (Ehrlich and S-180 cells) was evaluated by an MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The complex [Cu(H₂L³)Br]Br·H₂O was selected to study both the cellular and molecular mechanisms underlying its promising cytotoxicity in tumor cell S-180 and Ehrlich IC₅₀ 33.30 (±0.06) and 16.89 (±1.02) respectively. The Hoechst 33342/PI dual-staining assay showed the typical apoptotic morphology of cancer cells, and the RT-qPCR analysis revealed that the gene expressions were markedly increased in both the Ehrlich and S-180 cells exposed to 10 μM for 3 h. According to our results, this complex induces cell death through apoptosis that causes less damage to the body showing potential as a future drug against cancer. The cytotoxic activity of the compounds K3sz and K3iz were also evaluated by MTT test, in tumor cell MCF-7 and blood mononuclear cells PBMC, which is indicated as a normal cell to evaluate the selectivity of compounds.

Keywords: Vitamin B₆, Vitamin K₃, Schiff Bases, Copper (II), X-ray.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Câncer: Um breve panorama	18
1.2. Tiossemicarbazonas e Ditiocarbazatos	19
1.2. Vitaminas B ₆ e K ₃ e seus derivados	23
1.3. Compostos de Cobre(II)	28
2. Objetivos	35
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.1. Reagentes e Solventes.....	37
3.2. SÍNTESE DOS AGENTES COMPLEXANTES	37
3.2.1. Síntese do ligante Piridoxal aliloditiocarbazato (H ₂ L ¹).....	37
3.2.2. Síntese dos ligantes piridoxal feniltiossemicarbazona (H ₂ L ²) e piridoxal tiossemicarbazona (H ₂ L ³).....	38
3.2.3. Síntese dos ligantes menadiona semicarbazona (K ₃ sz) e menadiona isoniazida (K ₃ iz).....	39
3.3. SÍNTESE DOS COMPLEXOS	41
3.3.1. Síntese dos complexos cloro(piridoxal-aliloditiocarbazato)cobre(II) monohidrato, [Cu(HL ¹)Cl]·H ₂ O (1) e bromo(piridoxal-aliloditiocarbazato) cobre(II) monohidrato, [Cu(HL ¹)Br]·H ₂ O (2).	41
3.3.2. Síntese dos complexos cloro(piridoxal-feniltiossemicarbazona)cobre(II) monohidrato, [Cu(HL ²)Cl]·dmf (3) e bromo(piridoxal-feniltiossemicarbazona) cobre(II) monohidrato, [Cu(HL ²)Br]·H ₂ O·dmf (4).....	41
3.3.3. Síntese do complexo brometo de bromo(piridoxal-tiossemicarbazona)cobre(II) monohidratado, [Cu(H ₂ L ³)Br]Br·H ₂ O (5).	41
3.4. Difração de Raios X	41
3.5. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	46
3.6. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível e Condutância.....	46
3.7. Ressonância Magnética Nuclear ¹ H e ¹³ C	46

3.8	Ponto de Fusão (p.f.)	46
3.9	Atividade biológica	47
3.9.1	Linhagens celulares e cultura de células	47
3.9.2	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.....	48
3.9.3	Avaliação de apoptose e/ou necrose Avaliação de apoptose e necrose por coloração com Hoechst/PI.....	48
3.9.4	Avaliação da expressão Genica	49
3.9.5	Análise da ativação de caspase 3	50
3.9.6	Análise Estatística.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.4	Caracterização dos ligantes Derivados da Vitamina B6.....	53
4.5	Complexos Derivados da Vitamina B6	55
4.5.1	Análise estrutural dos complexos [Cu(HL ¹)Cl]·H ₂ O (1), [Cu(HL ¹)Br]·H ₂ O (2), [Cu(HL ²)Cl]·dmf (3), [Cu(HL ²)Br]·H ₂ O·dmf (4) e [Cu(H ₂ L ³)Br]Br·H ₂ O (5)	57
4.5.2	Análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho para os compostos 1-5.....	66
4.6	Análises Biológicas.	70
4.6.1	Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	70
4.6.2	Confirmação da indução de apoptose por dupla coloração com Hoechst 33342 e iodeto de propídio.....	73
4.6.3	Análise de expressão gênica por PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-qPCR).....	75
4.7	Complexos derivados da vitamina K ₃	76
4.7.1	Análise estrutural dos compostos K _{3sz} e K _{3iz}	77
4.7.2	Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	80
4.8	Análises biológicas.....	81
4.8.1	Avaliação da atividade citototóxica <i>in vitro</i>	82
5	CONCLUSÕES.....	85
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	APÊNDICE A: Espectros de RMN ¹ H e ¹³ C dos compostos H ₂ L ¹ , H ₂ L ² , H ₂ L ³ , K _{3sz} e K _{3iz}	97
	APÊNDICE B: Espectros de FT-IR dos complexos e seus respectivos ligantes.	101
	APÊNDICE C: Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-VIS dos complexos e seus respectivos ligantes.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura geral das tiossemicarbazonas em (a) e ditiocarbazatos em (b).....	19
Figura 2. Estrutura cristalina dos complexos: a) [Cu(Am4M)(OAc)] e b) [Zn(HAm4M)Cl ₂].	20
Figura 3. Representação da estrutura cristalina do complexo [Cu(sac)(S2AP)] em (a) e representação do complexo [Cu(sac)(S2AP)] ₂ em (b).	22
Figura 4. Representação estrutural do Tamoxifeno.	23
Figura 5. Representação das estruturas derivadas da vitamina B ₆	23
Figura 6. Representação da estrutura molecular da vitamina K3 (menadiona).....	24
Figura 7. Representação da estrutura cristalina e molecular do complexo [Co(H ₃ L ² ·Cl)(H ₃ L ² ·H ₂ O)].....	25
Figura 8. Representação estrutural dos compostos (a) [(plMedtc-2H)(VO)(μ-O)(VO)(plMedtc-2H)]·2CH ₃ OH e (b) [VO ₂ (plbdtc-H)].	27
Figura 9. Representação estrutural do Metronidazol.	28
Figura 10. Representação da estrutura cristalina do composto [AuPEt3(K3tsc)].	28
Figura 11. Representação da síntese para obtenção do ligante pltsc e formação de seus complexos de Cu (II).	29
Figura 12. Projeção estrutural do composto [Cu(pltsc)(H ₂ O) ₂]SO ₄	30
Figura 13. Representação da estrutura cristalina dos complexos (a) [Cu(Me2tsc1)Cl] ₂ e (b) [Cu(Me2tsc2)Cl] ₂	31
Figura 14. Projeção da estrutura cristalina do complexo [Cu(Ettsc)Cl] ₂ Cl ₂	31
Figura 15. Representação do esquema de síntese do ditiocarbazato aldtc.	38
Figura 16. Representação do esquema de síntese do ligante H ₂ L ¹	46
Figura 17. Representação do esquema de síntese dos ligantes H ₂ L ² e H ₂ L ³	46
Figura 18. Representação do esquema de síntese dos ligantes K3sz e K3iz.	40
Figura 19. Formas zwitteriônicas (esquerda) e tautoméricas neutras (direita) para os ligantes de derivados de piridoxal.	53
Figura 20. Esquema da síntese dos complexos (1-5).	56
Figura 21. Projeção ORTEP dos compostos Cu(HL ¹)Cl·H ₂ O e [Cu(HL ¹)Br]·H ₂ O. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.....	57
Figura 22. Projeção ORTEP dos compostos [Cu(HL ²)Cl]·dmf, [Cu(HL ²)Br]·H ₂ O·dmf. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.....	58
Figura 23. Projeção ORTEP do composto [Cu(H ₂ L ³)Br]Br·H ₂ O. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.	58
Figura 24. Representação das ligações hidrogênio do complexo (1). As linhas pontilhadas indicam as ligações hidrogênio intermoleculares existentes na estrutura.	63

Figura 25. Representação das ligações hidrogênio do complexo (5). As linhas pontilhadas indicam as ligações hidrogênio intermoleculares existentes na estrutura.	64
Figura 26. Cella unitária do composto (1) em (a) e do composto (2) em (b), segundo o plano cristalográfico <i>cb</i> . Em (c) o diagrama extraído da <i>International Tables for Crystallography</i> ⁷¹ referente ao grupo espacial $P2_1/n$	65
Figura 27. Cella unitária do complexo (5) em (a), vista através do plano cristalográfico <i>bc</i>	65
Figura 28. Cella unitária dos complexos (3) em (a) e (4) em (b) segundo o plano cristalográfico <i>ac</i> . Em (c) o diagrama extraído da <i>International Tables for Crystallography</i> ⁷¹ referente ao grupo espacial $C2/c$	66
Figura 29. Espectros eletrônicos dos complexos (1) a (5) nos solventes MeOH e dmf (concentração de 1×10^{-5} mol L ⁻¹).	68
Figura 30. Espectros eletrônico dos complexos (1) em preto, (2) em vermelho, (3) em azul, (4) em roxo e (5) em rosa, com concentração de 1×10^{-3} mol L ⁻¹ preparadas em metanol.	70
Figura 31. Efeito dos complexos (1-5) sobre a viabilidade de células murinas S-180 e Ehrlich tratadas com diferentes concentrações (0,2-200 μ M) e após 48 h de tratamento a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT. Os asteriscos (*) representam uma diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa quando comparados com células não estimuladas pelo teste de análise de variância ANOVA one-way. Os valores de significância estatística são indicados por asteriscos, representando valores de p (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).	72
Figura 32. Porcentagem de células S-180 e Ehrlich em apoptose e necrose de camundongos após tratamento com o complexo 5, por dupla coloração com HO / PI. Os dados mostram a média \pm DP de quatro animais por tratamento. A diferença de significância estatística com o controle, sem tratamento, são indicadas por asteriscos representando valores de p (** p <0,01; *** p <0,001).	73
Figura 33. Alterações morfológicas das células S-180 e Ehrlich detectadas por coloração dupla de Hoechst 33342 / PI após o tratamentos com o complexo 5, onde as alterações são indicadas pelas seguintes informações: a viabilidade é indicada pela cromatina azul com estrutura organizada, na necrose observa-se a cromatina vermelha com estrutura organizada, a apoptose precoce (cromatina azul brilhante altamente condensada ou fragmentada) e apoptose tardia (cromatina rosa ou vermelha altamente condensada ou fragmentada).	74
Figura 34. Efeitos do tratamento com o complexo (5) na expressão de mRNA em células S-180 e Ehrlich.	75
Figura 35. Atividades proteolíticas na caspase 3 após o tratamento com o complexo (5) nas células S-180 e Ehrlich.	76
Figura 36. Projeção ORTEP do composto K3sz. Elipsoides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.	77

Figura 37. Projeção ORTEP do composto K3iz. Elipsoides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.	78
Figura 38. Projeção da cela unitária dos compostos (a) K3sz e (b) K3iz, vista através do plano cristalográfico ab. Em (c) o diagrama extraído da International Tables for Crystallography ⁷⁷ referente ao grupo espacial <i>PI</i>	80
Figura 41. Representação estrutural dos compostos K ₃ sz e K ₃ iz e os valores de deslocamento químico de ¹ H e ¹³ C.....	81
Figura 42. Efeito dos compostos K ₃ sz e K ₃ iz sobre a viabilidade de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações (2-200 μM) e após 24 h de tratamento a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalinas dos compostos (1) e (2).....	43
Tabela 2. Dados da coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalinas dos compostos (3), (4) e (5).....	44
Tabela 3. Dados da coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalinas dos compostos K ₃ sz e K ₃ iz.	45
Tabela 4. Sequências de primers utilizados para o ensaio real time RT-qPCR.....	50
Tabela 5. Sinais de RMN ¹ H e ¹³ C.	54
Tabela 6. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para os complexos 1-5. Os desvios encontram-se entre parênteses.....	60
Tabela 7. Ligações de hidrogênio dos complexos 1-5, com os respectivos comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação. Os desvios encontram-se entre parênteses.....	62
Tabela 8. Frequências (cm ⁻¹) de estiramento e deformação angular dos modos normais de vibração selecionados para os compostos H ₂ L ¹ , H ₂ L ² , H ₂ L ³ e (1-5).	67
Tabela 9. Análise de espectroscopia eletrônica dos ligantes H ₂ L ¹ , H ₂ L ² , H ₂ L ³ e os complexos (1-5). Bandas de transição eletrônicas em nm, por espectroscopia UV-VIS.	68
Tabela 10. Análise de espectroscopia eletrônica dos complexos de cobre (II) na região do visível com concentração de 1x10 ⁻³ molL ⁻¹ . Bandas de transição eletrônica em nm.....	70
Tabela 11. Atividade citotóxica (IC ₅₀), dos ligantes livres H ₂ L ¹ , H ₂ L ² e H ₂ L ³ , dos complexos (1-5) e da doxorrubicina, tratados durante 48 horas com concentrações entre 0,2 a 200 µmol.L ⁻¹ nas linhagens celulares S-180 e Ehrlich.	71
Tabela 12. Comprimentos e ângulos de ligação selecionados dos compostos K ₃ sz e K ₃ iz. Os desvios encontram-se entre parênteses.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

v	Estiramento
δpy	Deformação angular do anel piridina
Py	Piridina
Ph	Fenil
dmf	N,N-dimetilformamida
MeOH	Metanol
PPh_3	Trifenilfosfina
FT-IR	Infravermelho por transformada de Fourier
p.f.	Ponto de fusão
aldtc	Alilditio-carbazato
H_2L^1	Piridoxal-alilditio-carbazato
H_2L^2	Piridoxal-feniltiossemicarbazona
H_2L^3	Piridoxal-tiossemicarbazona
K_3sz	Menadiona-semicarbazona
K_3iz	Menadiona-izoniazida
tsc	Tiossemicarbazonas
dtc	Ditio-carbazatos
TCLM	Transferência de carga ligante-metal
IV	Infravermelho
<i>d6</i> -DMSO	Dimetilsulfóxido- d_6
HeLa	Linhagem de célula tumoral humana (câncer cervical)
SGC-7901	Linhagem de célula tumoral humana (câncer gástrico)
MDA-MB-231	Linhagem de célula tumoral humana (adenocarcinoma mamário)
MCF-7	Linhagem de célula tumoral humana (adenocarcinoma mamário)
A2780	Linhagem de célula tumoral humana (câncer de ovário)
U937	Linhagem de célula tumoral humana (linfoma Histiocítico difuso)

CEM	Células Estromais Mesenquimais
K562	Linhagem de célula tumoral humana (leucemia mieloide crônica)
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
S-180	Linhagem de célula tumoral murino (sarcoma)
Ehrlich	Linhagem de célula tumoral (carcinoma ascítico)
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Química Medicinal, segundo definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)¹, é uma área da química que engloba aspectos das ciências biológica, médica e farmacêutica, visando o planejamento, a invenção, a descoberta, a identificação e a preparação de compostos biologicamente ativos, bem como, o estudo do metabolismo, a interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica desses compostos.

A Química Bioinorgânica Medicinal é uma área interdisciplinar e em constante avanço. É uma ciência caracterizada por estudos dos íons metálicos e seus complexos em sistemas biológicos. Como consequência, vêm sendo modulados diversos ligantes para a formação de complexos metálicos utilizados no tratamento de diversas enfermidades. Tem-se observado que a atividade biológica dos complexos está relacionada aos metais utilizados, a atividade de seus ligantes e a sua geometria conformacional.^{2,3}

O desenvolvimento da química de coordenação apresenta importância significativa devido a suas estruturas e possíveis aplicações, com potencial na farmacologia, bioquímica, indústria química, entre outras. O uso de compostos inorgânicos como agentes terapêuticos é relatado desde a antiguidade, porém o destaque da área de bioinorgânica ocorre desde o século XX, a partir da descoberta de novos compostos de arsênio pelo químico Paul Ehrlich e que se tornaram base no tratamento de sífilis.⁴ Um marco na história da Química Bioinorgânica foi a aplicação no tratamento do câncer do complexo *cis*-diaminodichloroplatina(II), de nome comercial “cisplatina” a partir de 1978, sendo que atualmente outros complexos de platina, como a Carboplatina, são utilizados como anti-metastático. Desde então, variados complexos metálicos com propriedades biológicas foram desenvolvidos e são utilizados na terapia e diagnóstico de diferentes doenças, tais como, complexos de ouro utilizados no tratamento de artrite reumatoide, complexos de prata utilizados como agentes antibacterianos, além de compostos com gadolínio que atuam como agentes de contraste no imageamento por ressonância magnética nuclear.⁵⁻⁷

O cobre é um elemento traço essencial que é amplamente distribuído em tecidos animais e vegetais. Ele também atua como um cofator para um número de metaloenzimas, como catalase, peroxidase, citocromo oxidase e galactose oxidase para otimizar a função enzimática. A importância substancial do cobre nos sistemas biológicos aumentou o interesse na química de coordenação do cobre coordenado a ligantes doadores de elétrons como sistemas biomiméticos. Dessa forma, os complexos de cobre têm sido estudados

extensivamente como análogos de biomoléculas, como por exemplo, metaloenzimas que mediam a ativação de oxigênio no organismo, transferência de elétrons e processos de transporte de elétrons.^{8,9}

As bases de Schiff são um grupo interessante de compostos orgânicos, que formam uma grande classe de compostos que se caracterizam pela presença de um grupo imínico ($R_2C=NR'$) e são versáteis devido à sua estabilidade, propriedades quelantes e aplicações biológicas.¹⁰ Atualmente, as bases de Schiff derivadas de vitaminas são estudadas como agentes quimioterápicos em diversos tipos de doenças. Além disso, os complexos metálicos com ligantes de base de Schiff derivados de vitaminas aumentam a absorção em células e a seletividade do complexo metálico.¹¹

1.1. Câncer: Um breve panorama

Atualmente o câncer é uma das doenças mais temidas na sociedade moderna, devido aos altos índices de mortalidade, efeitos colaterais aos tratamentos e danos irreparáveis ao organismo. A origem da palavra câncer é latina *cancer* onde o significado é “caranguejo” uma referência ao modo de crescimento, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia para se fixar como modo de defesa, sendo que esta relação poderia ser comparada ao enraizamento das plantas.¹²

A neoplasia é uma referência à definição científica de câncer sendo uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de células anormais. Em vários sistemas de células no corpo, existem quase 200 tipos, os quais se diferenciam pela sua localização no organismo e sua potencialidade em espalhar-se por outros tecidos e órgãos.

O Instituto Nacional do Câncer, faz o monitoramento da incidência, da morbidade hospitalar e da mortalidade causados por diversos tipos de câncer, e no ano de 2018, foram obtidos registros que indicam que no Brasil o tipo de câncer primário com maior incidência em homens é o câncer de próstata, com 68.220 novos casos registrados e o câncer de mama ocorre com maior incidência em mulheres com 59.700 casos novos registrados. Estima-se, para o Brasil, que de 2018 a 2019, haverá a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano, sendo que essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes.¹³

1.2. Tiossemicarbazonas e Ditiocarbazatos

As tiossemicarbazonas (tsc) e os ditiocarbazatos (dtc) vêm sendo investigados por muitas décadas. Estes compostos são bases de Schiff derivadas de iminas e formadas através de reações de condensação entre um aldeído ou cetona com uma tiossemicarbazida ou derivados de ditiocarbazatos, conforme representados na Figura 1, sendo os grupos R^1 , R^2 , R^3 , $R^4 = H$, arilas, alilas ou alquilas.

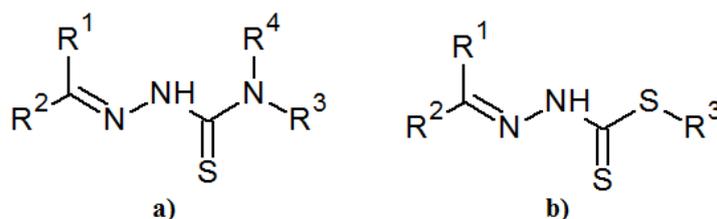


Figura 1. Representação da estrutura geral das tiossemicarbazonas em (a) e ditiocarbazatos em (b).

Estes compostos apresentam alta deslocalização eletrônica, principalmente quando grupos aromáticos encontram-se ligados ao carbono azometínico.^{10,14} Do ponto de vista biológico, as tsc e os dtc pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecidas por suas importantes aplicações na pesquisa de novos fármacos, devido ao seu amplo espectro de ação, tais como, aplicações como agentes antitumorais, antimicrobianos, antivirais, antimaláricos, antituberculose e antiparasitários.¹⁵⁻¹⁹

Esta classe de compostos são objeto de extensas investigações, visto que representam duas classes de agentes quelantes importantes e que possibilitam a formação de variados complexos metálicos devido à presença de átomos doadores de elétrons, como nitrogênio e enxofre. Dentre os modos de coordenação possíveis destes agentes quelantes, ocorre principalmente a formação de estruturas mono, bi ou tridentadas, coordenadas através de átomos de nitrogênio e enxofre, ou átomos adicionais dos grupos aldeído ou cetona precursores na síntese.^{20,21}

Pode-se destacar que, em alguns casos, a eficiência destas bases de Schiff como agentes terapêuticos podem ser otimizadas pela formação de complexos metálicos e modificações em suas cetonas e aldeídos precursores. Estudos recentes indicam que quando complexados a metais de transição, como Cu(I)/(II), Ni(II), Au(I)/(III), dentre outros, estes compostos podem ser mais ativos do que o ligante em sua forma livre, uma vez que o complexo pode intensificar a atuação do ligante e o metal pode estar envolvido no mecanismo da ação biológica ou pode atuar como um transportador do ligante.²²⁻²⁴

A atividade antitumoral têm sido a mais estudada para a classe das tsc, sendo atribuída à capacidade inibidora da enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, a qual está

envolvida na biossíntese do DNA das células. Por exemplo, a $\alpha(N)$ -heterocíclicas Triapina, que está atualmente em grande avanço em ensaios clínicos como um agente antitumoral e demonstra atividade promissora, principalmente em doenças hematológicas malignas.²⁵ Conforme reportado na literatura, quando as tiossemicarbazonas estão coordenadas a metais de transição possuem maior seletividade para células tumorais em estudos comparando os complexos e seus ligantes livres, onde há um aumento da citotoxicidade em células tumorais quando a tsc está coordenada à alguns metais, e podem diminuir os efeitos colaterais devido ao tipo de morte celular causada pelos complexos metálicos com esta classe de ligantes.²⁶⁻²⁸

As tsc possuem sítios de coordenação em seus grupos substituintes R^1 ou R^2 , onde é observado que predominam a classe de ligantes doadores *NNS* ou *NOS*, por conta de sua ajustável taxa de doação de elétrons, diversidade estrutural e propriedades químicas, biológicas e medicinais. A estabilidade dos complexos metálicos formados com tsc dependem do íon metálico, do átomo doador do grupo funcional adicional, da posição e do tipo de substituintes na cadeia das tsc. A interação de tsc com vários metais, tais como, o cobre(I), prata(I), ouro(I), mercúrio(II), paládio(II), platina(II), rutênio(II) e níquel(II) produziram complexos mono-, di- e tridentados, além de complexos polinucleares.^{22,29-31}

Estudos realizados por Shao e colaboradores³² apresentam a síntese, caracterização e atividade biológica de estruturas com tsc derivadas do (*Z*)-2-(amino(piridin-2-il)metileno)-*N*-metilhidrazinocarbotioamida (HAm4M) coordenadas aos metais Cu(II) e Zn(II), representadas na Figura 2.

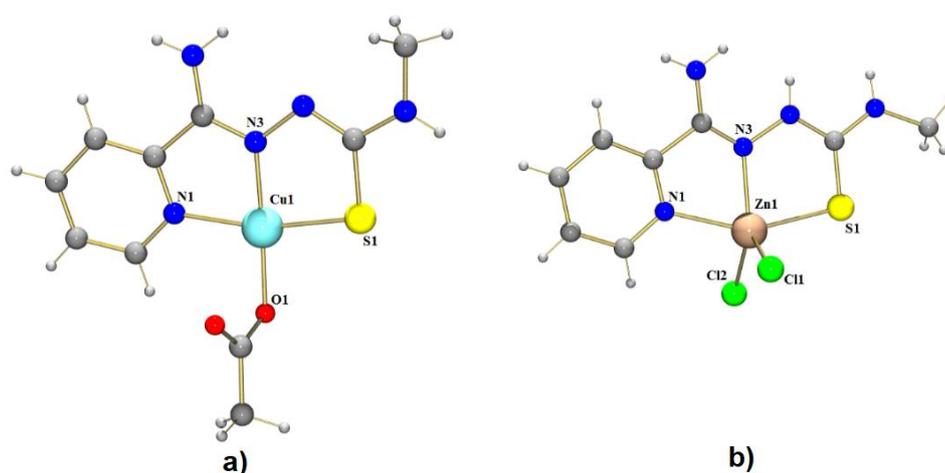


Figura 2. Estrutura cristalina dos complexos: a) [Cu(Am4M)(OAc)] e b) [Zn(HAm4M)Cl₂].

Através da elucidação das estruturas cristalinas e moleculares por difração de raios X dos complexos [Cu(Am4M)(OAc)] e [Zn(HAm4M)Cl₂], observa-se que eles

cristalizam nos sistemas cristalinos, monoclinico e triclínico, nos grupos espaciais $P2_1/c$ e $P\bar{1}$, respectivamente.

Na unidade assimétrica de $[Cu(AM_4M)(OAc)]$, o átomo de cobre encontra-se na forma tetracoordenada ligado aos átomos *NNS* da tsc e a um íon acetato, constituindo assim uma geometria quadrada planar.

No complexo $[Zn(HAM_4M)Cl_2]$ é observado que sua cela unitária é constituída por dois átomos de zinco independentes, ambos pentacoordenados ao ligante HAM₄M e dois íons cloretos. Em cada centro de zinco pode-se confirmar através dos parâmetros de Addison³³ uma geometria pirâmide quadrada distorcida. O ligante HAM₄M encontra-se coordenado de forma tridentada através de seus átomos de nitrogênio N-piridinico e N-azometínico, e ao átomo de enxofre.

Os complexos apresentam grupos lábeis, como acetato e cloretos, o que aumentam a possibilidade de interação com biomoléculas. Foi analisada a atividade antitumoral desses compostos por métodos colorimétricos e análise morfológica, em célula tumorais de diversas linhagens, como HeLa – célula tumoral humana (câncer cervical), HepG-2 – célula tumoral humana (câncer no fígado) e SGC-7901 – célula tumoral humana (câncer gástrico), onde verificou-se que principalmente o composto de cobre apresenta citotoxicidade elevada em baixas dosagens e alta seletividade em relação a células humanas normais. Neste estudo também é apresentado a interação dos compostos de tsc com o DNA, onde observa-se a efetividade cinética destes compostos no meio intracelular, indicando assim uma alta eficiência como agente antitumoral e baixa toxicidade.

Em diversos estudos é observado que vários complexos metálicos com ligantes derivados de dtc, contendo nitrogênio, enxofre e/ou oxigênio como átomos doadores de elétrons, apresentam uma grande variedade de propriedades farmacológicas. Por isso, seus estudos têm recebido atenção para diversos tipos de tratamentos quimioterápicos.

Recentemente, foram relatados estudos de interação com o DNA de células e ensaios de citotoxicidade para complexos de Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Cd(II) derivados de ditiocarbazatos S-substituído, mas curiosamente apenas os complexos de Cu(II) apresentaram atividades biológicas promissoras. Esta afinidade com o DNA dos complexos de Cu(II) foi confirmada devido à capacidade desses complexos bloquear a ligação enzimática entre as bases nitrogenadas de DNA ou RNA das células tumorais.^{24,34}

Em estudos realizados por Mokhtaruddin e colaboradores³⁵, foi realizado a síntese e caracterização de complexos onde o composto S-2-metilbenzilditiocarbazato condensado ao 2-acetil-4-metilpiridina (S-2aph) foi complexado à um sacarinato (sac) de Cu(II).

Na figura 3a podemos observar a unidade assimétrica do um complexo de Cu(II) centrosimétrico dinuclear, Figura 3b, onde cada centro metálico é complexado através dos doadores de S-tiolato, N-azometínico e N-piridil do ânion S2AP⁻, e completando a esfera de coordenação uma ligação com o N-sac e um átomo de O-carbonil do um ânion sac⁻ relacionando-se por simetria.

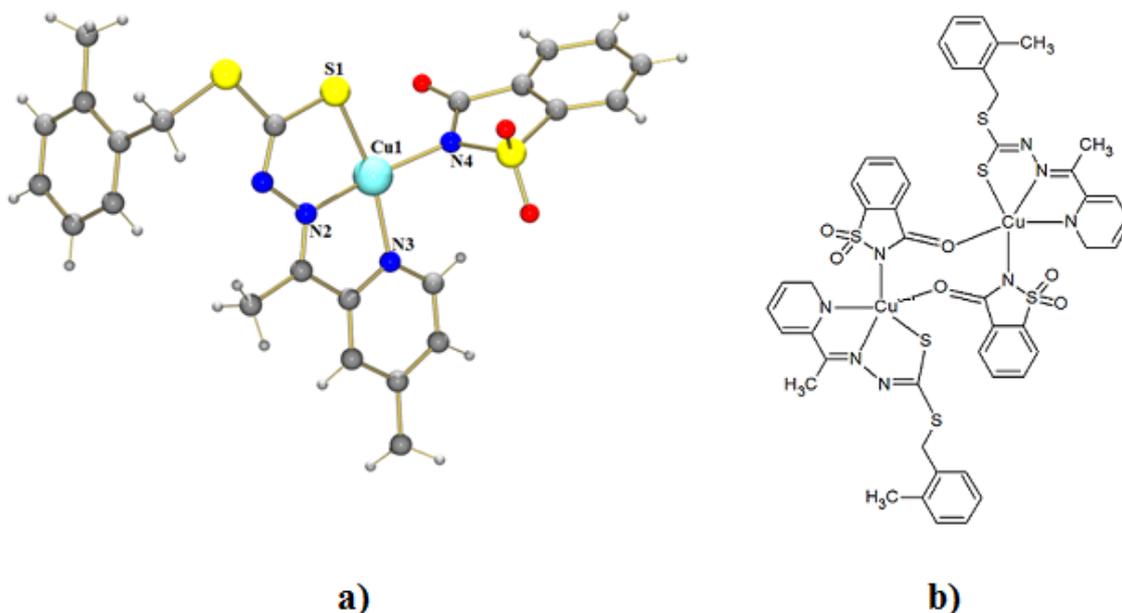


Figura 3. Representação da estrutura cristalina do complexo [Cu(sac)(S2AP)] em (a) e representação do complexo [Cu(sac)(S2AP)]₂ em (b).

Este complexo cristalizou no sistema cristalino triclinico e grupo espacial $P\bar{1}$. O centro metálico de Cu(II) se apresenta pentacoordenado com geometria pirâmide quadrada distorcida. No ligante S2ap é observado duas regiões planares articuladas entre o átomo de enxofre do dtc, onde o anel encontra-se quase perpendicular ao plano basal. A planaridade da ligação entre o metal e o dtc consiste na deslocalização da densidade de elétrons π sobre o esqueleto do ligante.

A atividade citotóxica destes compostos foi realizada frente a linhagem de células tumorais MDA-MB-231 – célula tumoral humana (adenocarcinoma mamário) e MCF-7 – célula tumoral humana (adenocarcinoma mamário), comparando-se a efetividade dos ligantes na forma livre e do complexo sintetizado. Estas células são comumente utilizadas para investigar o câncer de mama em estágio avançado com opções limitadas de tratamento, pois apresentam em seus perfis de genoma um agrupamento com o subtipo basal deste tipo de câncer. Verificou-se que o dtc na forma livre é inativo frente as linhagens de células analisada, porém os seu complexo de Cu(II) mostrou-se eficiente, com os valores de IC₅₀ inferiores ao controle positivo apresentado na figura 4, o “Tamoxifeno”,

fármaco atualmente utilizado no tratamento do câncer de mama que infelizmente possui uma forte resposta hepatocarcinogênica em longos tratamentos³⁶.

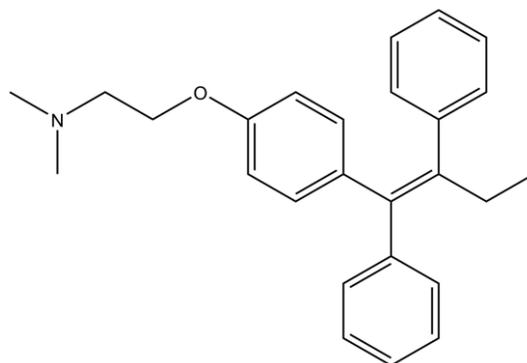


Figura 4. Representação estrutural do Tamoxifeno.

Pode-se indicar que a efetividade antitumoral deste complexo ocorre devido a vários fatores, como a planaridade do complexo e devido aos íons metálicos estarem coordenados a ligantes quelantes que formam complexos mais lipofílicos, permitindo assim um acesso mais fácil às células tumorais ao auxiliar na permeabilidade através da membrana celular e posteriormente atingir os alvos biológicos sem sofrer alterações estruturais profundas que resultem na sua inatividade.

1.2. Vitaminas B₆ e K₃ e seus derivados

A vitamina B₆ é um termo genérico para um grupo de seis vitaminas hidrossolúveis, do complexo B, que ocorrem naturalmente como a piridoxina, a piridoxal e a piridoxamina, além de seus derivados fosforilados, conforme estruturas representadas na Figura 5.

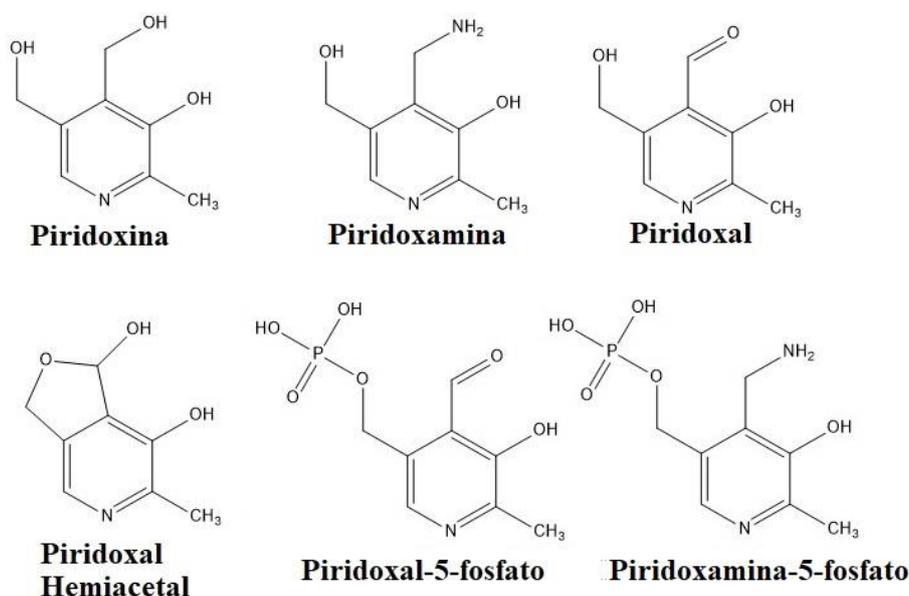


Figura 5. Representação das estruturas derivadas da vitamina B₆.

Uma das formas biologicamente ativas da vitamina B₆ é o piridoxal-5-fosfato (PLP), que atua em várias reações enzimáticas, tais como, a transaminação, a descarboxilação, a racemização, a biossíntese do DNA e de compostos antibióticos.³⁷

A vitamina B₆ desempenha um importante papel como um fator de proteção em vários tipos de câncer no organismo, onde os seus derivados atuam na diminuição da proliferação celular tumoral, inibindo o crescimento de alguns tumores. No organismo a vitamina B₆ pode ser transportada para as células, principalmente por difusão facilitada, através de transportadores específicos da membrana celular. Dado que as células tumorais crescem rapidamente, elas têm uma maior procura por vitaminas B₆, pois contendo estas moléculas, podem ser absorvidas pelos transportadores específicos em células tumorais.^{38,39} Com isso, observa-se o interesse em utilizar a vitamina B₆ na obtenção de complexos metálicos, pois seriam mais seletivas para células tumorais devido ao seu comportamento no organismo.⁴⁰ Além disso, há evidências de que esta vitamina possui valor terapêutico contra algumas doenças, como a artrite reumatoide, e que a sua deficiência no organismo pode aumentar o risco de doença de Parkinson.³⁷

A piridoxina exibe diferentes sítios de coordenação com metais de caráter duro ou macio, onde é comumente observado que em sua forma de zwitterion, ou seja, um composto químico eletricamente neutro, mas que possui cargas positiva e negativa em diferentes átomos, sendo que a ligação ocorre via átomo de oxigênio do grupo fenolato e do grupo hidroximetil adjacente desprotonado, porém em alguns complexos é observado também a coordenação via átomo de nitrogênio da piridina.³⁷

A vitamina K₃, também conhecida usualmente como menadiona, 2-metil-1,4-naftoquinona, possui a estrutura molecular apresentada na Figura 6 Ela é um membro sintético lipossolúvel do grupo da Vitamina K que possui atividade anticoagulante no organismo e seus derivados são solúveis em água e apresentam diversas atividades biológicas.^{41,42}

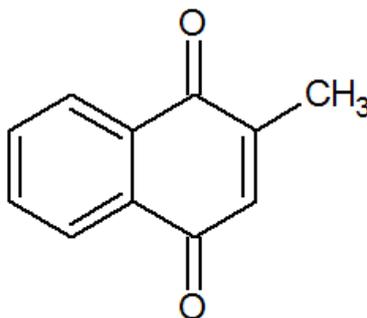


Figura 6. Representação da estrutura molecular da vitamina K3 (menadiona).

As menadionas são precursoras na obtenção de diversas bases de Schiff, como as tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos. Estes agentes complexantes e seus complexos metálicos apresentam ampla aplicação farmacológica, como por exemplo, são utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, além de outras atividades biológicas como inibidores da influenza e varíola, e também podem ser utilizados em pesticidas e fungicidas.⁴³⁻⁴⁹

Recentemente, várias pesquisas foram publicadas relatando a síntese e atividade biológica dos complexos de metais de transição com tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos derivadas do piridoxal.^{37,50} Conforme reportado esses compostos são de grande interesse devidos suas formas neutra, mono e dianiônica em soluções, predominando seu modo de coordenação com os grupos N-imina, O-fenol e S-tiol.

Em 2014, Manikandan e colaboradores,⁵¹ apresentaram a síntese, caracterização estrutural e análise biológica de tsc derivados do piridoxal e seus respectivos complexos de Co(III). O composto piridoxal-N-fenil-tiossemicarbazona hidrocloreto ($H_3L^2 \cdot Cl$), foi sintetizado através de reação de condensação entre o piridoxal e a fenil-tiossemicarbazida. Foi sintetizado um complexo a partir deste ligante em uma mistura equimolar com o composto $[CoCl_2(PPh_3)_2]$. A estrutura cristalina e molecular do complexo $[Co(H_3L^2 \cdot Cl)(H_3L^2 \cdot H_2O)]$ encontra-se na representada na Figura 7.

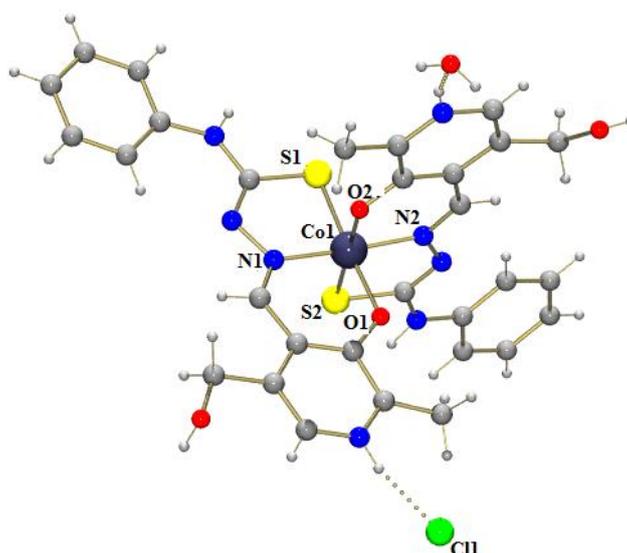


Figura 7. Representação da estrutura cristalina e molecular do complexo $[Co(H_3L^2 \cdot Cl)(H_3L^2 \cdot H_2O)]$.

O complexo $[Co(H_3L^2 \cdot Cl)(H_3L^2 \cdot H_2O)]$ cristalizou no sistema monoclinico e com grupo espacial $P2_1/c$. Na unidade assimétrica o Co(III) encontra-se coordenado a duas moléculas do ligante atuando de forma tridentada, através dos átomos N-imina, S-tiol, e O-fenil, e apresentando uma geometria octaédrica distorcida. Embora os átomos doadores

e os modos de ligação das duas moléculas do ligante sejam iguais, eles não são de natureza idêntica, pois um ligante está coordenado ao metal de forma dianiônica e o outro de forma monoaniônica.

Estes compostos foram submetidos aos estudos das suas potenciais propriedades biológicas, tais como, ligação e/ou clivagem do DNA, ligação com proteínas, atividade antioxidante e citotoxicidade. A interação do complexo $[\text{Co}(\text{H}_3\text{L}^2\cdot\text{Cl})(\text{H}_3\text{L}^2\cdot\text{H}_2\text{O})]$ com o DNA foi avaliada por espectroscopia de fluorescência, sendo observado a possibilidade de interação com o DNA via intercalação devido ao hipocromismo com cerca de 20,12% apresentado nas bandas de emissão específicas em 428 e 414 nm. Através da análise quantitativa de monitoramento das bandas de emissão específicas que indicam a interação do complexo com o DNA, foi determinado a constante de interação de ligação intrínseca pela equação de Scatchard. O alto valor de constante determinado para o complexo por $1,76 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}$, sugeriram que esta ligação pode ocorrer fortemente devido à substituição do grupo fenil da tsc, sendo que a interação deste grupo com o DNA é favorecida pela presença do grupo aromático⁵². As propriedades de interação do complexo com proteínas foram também examinadas por espectroscopia de fluorescência, e analisada por constante de ligação monitorando o decréscimo das bandas de emissão específicas, sendo que o valor de constante encontrado em $1,27 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}$ sugere que a afinidade de ligação aumenta na substituição do grupo fenil ligado ao nitrogênio terminal das tsc, promovendo a interação com o DNA⁵³.

O comportamento do complexo de Co(III) frente à linhagem de células tumorais MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e HeLa (câncer cervical) foi comparado com a tsc na forma livre. Os valores de IC_{50} indicam que a tsc livre é inativa frente às células estudadas, porém o complexo $[\text{Co}(\text{H}_3\text{L}^2\cdot\text{Cl})(\text{H}_3\text{L}^2\cdot\text{H}_2\text{O})]$ apresenta alta citotoxicidade e uma inibição celular maior do que o controle *cisplatina*. Este comportamento pode ser indicativo da forte interação do grupo fenil da tsc, presente no complexo, com o DNA das células e proteínas.

Mesmo com poucos compostos relatados na literatura, em 2006, Maurya e colaboradores,¹¹ apresentaram um trabalho com compostos de coordenação e ligantes dtc derivados do piridoxal, complexados a dioxovanádio(IV). Estes compostos foram sintetizados em metanol a partir dos ligantes piridoxal-S-benzilditiocarbazato (plbdtc) ou piridoxal-S-metilditiocarbazato (plMedtc), em proporções equimolares com $[\text{VO}(\text{acac})_2]$. Como resultados foram obtidos dois complexos, sendo um mononuclear $[\text{VO}_2(\text{plbdtc-H})]$

e outro binuclear $[(\text{plMedtc-2H})(\text{VO})(\mu\text{-O})(\text{VO})(\text{plMedtc-2H})]\cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$, apresentados na Figura 8.

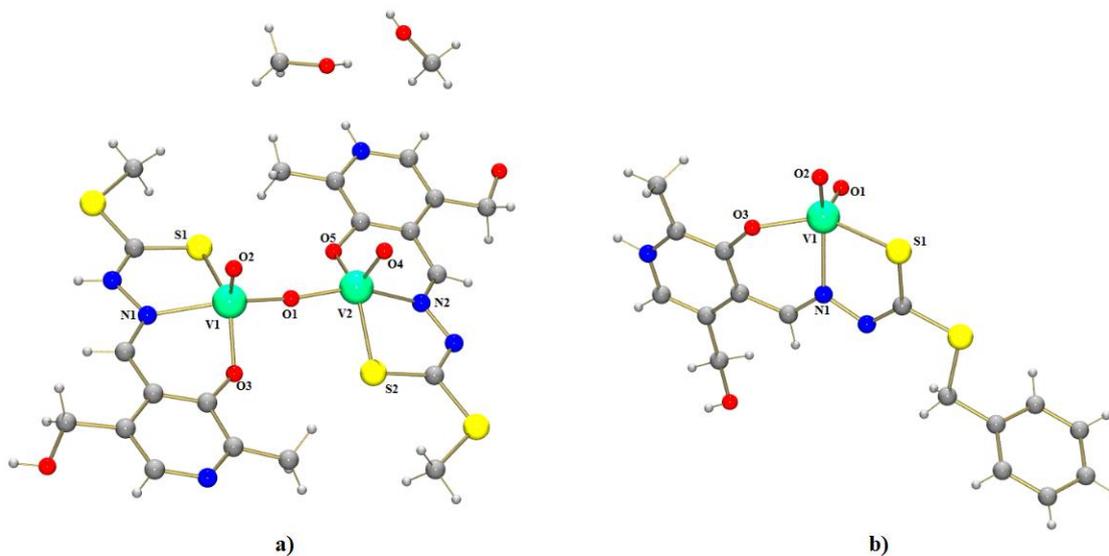


Figura 8. Representação estrutural dos compostos (a) $[(\text{plMedtc-2H})(\text{VO})(\mu\text{-O})(\text{VO})(\text{plMedtc-2H})]\cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ e (b) $[\text{VO}_2(\text{plbdtc-H})]$.

O complexo mononuclear cristalizou em um sistema cristalino triclinico e grupo espacial $P\bar{1}$ e o complexo dinuclear em um sistema monoclinico e grupo espacial $P2_1/c$. A formação do complexo dinuclear está relacionada pela perda do próton localizado no átomo de nitrogênio da piridina no ligante plMedct, enquanto este efeito não é observado no complexo mononuclear. Para os dois complexos, o íon metálico está pentacoordenado com uma geometria pirâmide de base quadrada distorcida, com os átomos N-imina, O-fenolato e S-tiolato do ligante e um átomo de oxigênio do grupo dioxo formando a base da pirâmide.

Foi realizado o ensaio antiamebiano *in vitro* dos ligantes e seus respectivos complexos de oxovanádio(IV), frente a linhagem HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica*, que é uma espécie de protozoário causador de disenterias graves com sangue e muco, podendo progredir para abscesso amebiano do fígado, a amebíase. Observou-se que para os ligantes plbdtc, plMedtc e para o complexo binuclear, não houve resultado efetivo para inibição deste tipo de ameba. Porém, para o complexo $[\text{VO}_2(\text{plbdtc-H})]$ foi observado inibição efetiva com uma concentração menor do que o controle metronidazol ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$), medicação comumente utilizada na amebíase, apresentado na figura 9. Uma possível explicação é que nos complexos, a polaridade dos ligantes e do íon metálico, é reduzida devido ao equilíbrio de carga, o que favorece o transporte dos complexos através da camada lipídica da membrana celular.

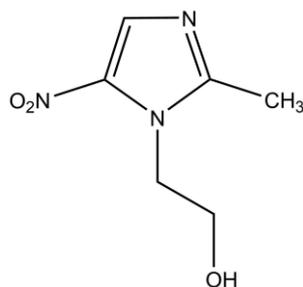


Figura 9. Representação estrutural do Metronidazol.

Mesmo com poucas publicações sobre o assunto, Casas e colaboradores,⁵⁴ publicaram a caracterização estrutural e atividade antitumoral de um novo complexo de ouro(I) com o ligante tiossemicarbazona derivada da menadiona bisulfito de sódio, [AuPEt₃(K₃tsc)], conforme representado na Figura 10.

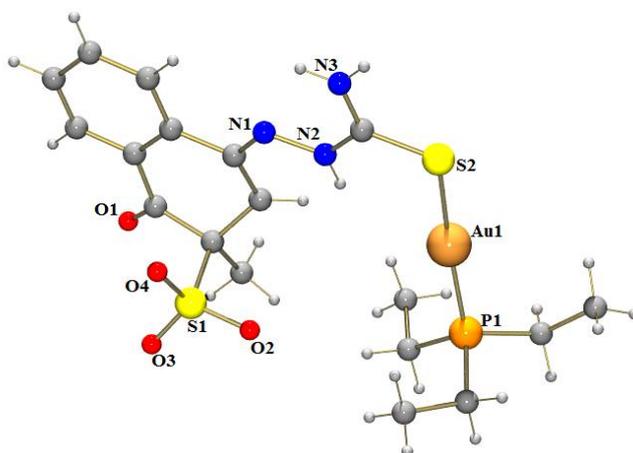


Figura 10. Representação da estrutura cristalina do composto [AuPEt₃(K₃tsc)].

O composto cristalizou em sistema cristalino triclinico e grupo espacial $P\bar{1}$, onde o centro metálico Au(I) está coordenado a um átomo de enxofre do ligante K₃tsc⁻ e ao átomo de fósforo da fosfina, apresentando uma geometria linear distorcida.

A atividade biológica do ligante tiossemicarbazona derivado da vitamina K₃ e do complexo de Au(I) obtido, foi avaliada frente a linhagem de células tumorais A2780, e A2780cis, que são resistentes ao medicamento *cisplatina*. Foi observado que o ligante livre é inativo frente às células analisadas, porém o complexo de Au(I) foi efetivo, com atividade biológica superior ao medicamento *cisplatina*. Estes resultados indicam que o centro metálico proporciona a formação de um complexo neutro e otimiza o transporte do ligante bioativo em meio intracelular para que o mesmo atinja seu alvo.

1.3. Compostos de Cobre(II)

A química de coordenação do cobre (II) é bastante estudada e está inserida na formação de diversos poliedros coordenativos. Normalmente possui número de

coordenação entre 4 e 6 que resulta na formação de compostos com geometria quadrado planar, tetraédrica, pirâmide de base quadrada, bipirâmida trigonal ou octaédrica. O interesse em compostos de cobre ocorre devido sua acessibilidade, disponibilidade e baixo custo. Além disso, complexos de cobre(II) são candidatos promissores para o tratamento do câncer, onde é observado na literatura variados estudos sobre a sínteses e atividades citotóxicas de complexos com cobre(II). Alguns complexos deste metal, são eficazes devido a algumas propriedades específicas como, a redução do tamanho do tumor, a diminuição da metástase e o aumento significativo da sobrevida dos pacientes.^{9,55}

Estudos de complexos de cobre(II) com ligantes piridoxal-tiossemicarbazonas (pltsc) e piridoxal-semicarbazonas (plsc) estão sendo desenvolvidos para aplicações em diversas doenças. Ferrari e colaboradores^{56,57} publicaram na década de 90 uma grande quantidade destes compostos. Um exemplo é a síntese e caracterização dos compostos de Cu(II) com piridoxal tiossemicarbazona onde, onde a reação ocorre em 15 minutos em aquecimento, conforme representado na Figura 11.

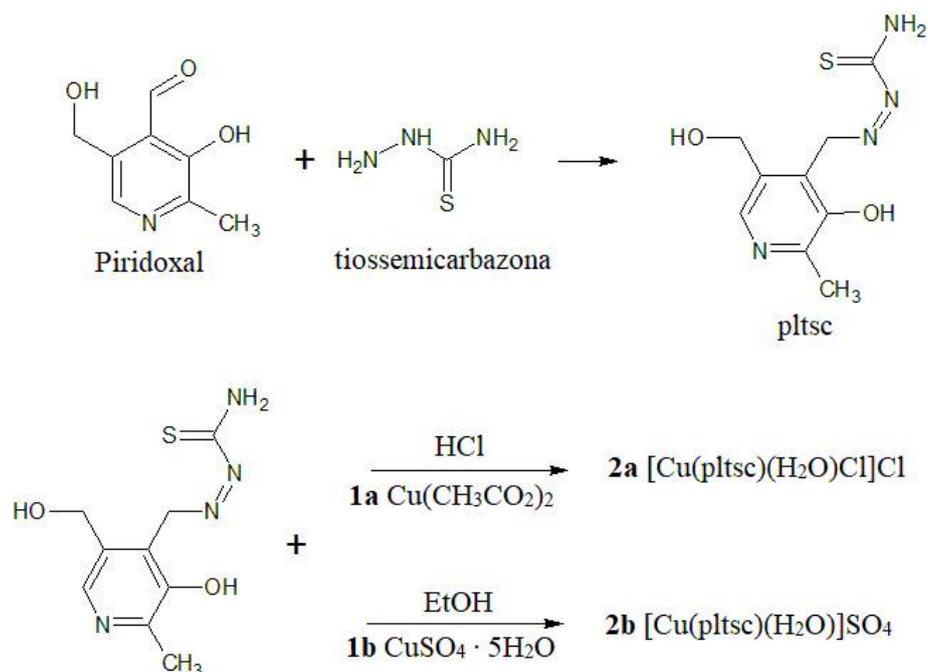


Figura 11. Representação da síntese para obtenção do ligante pltsc e formação de seus complexos de Cu (II).

Observa-se que o átomo de cobre(II) se encontra pentacoordenado, através dos átomos O-fenólico, N-imina e enxofre do ligante pltsc, além de duas moléculas de água que completam a poliedro de coordenação na forma de uma pirâmide de base quadrada distorcida, representado na Figura 12.

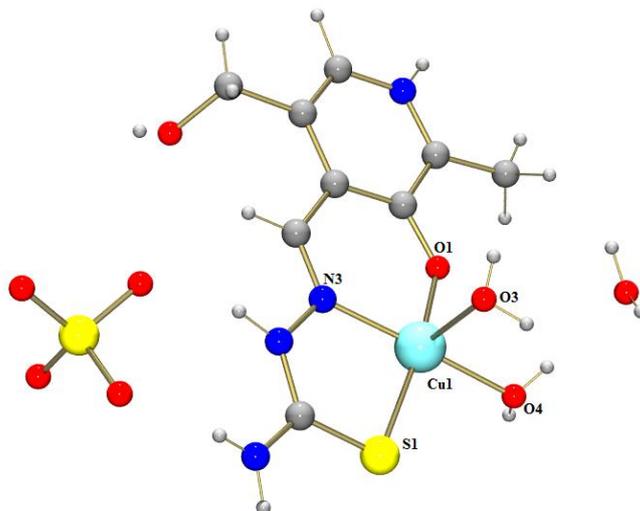


Figura 12. Projeção estrutural do composto $[\text{Cu}(\text{pltsc})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4$.

O complexo $[\text{Cu}(\text{pltsc})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4$, cristaliza no sistema triclinico e grupo espacial $\text{P}\bar{1}$, apresentando duas moléculas em sua unidade assimétrica. Observa-se os comprimentos de ligação Cu–O de: Cu–O(1) 1,888 Å, Cu–O(3) 1,994 Å e Cu–O(4) 2,262 Å, que devido a forma de zwitterion do piridoxal ocasiona carga negativa no oxigênio desprotonado do grupo fenólico proporcionando o encurtamento da ligação.

O estudo da atividade biológica deste composto foi avaliado onde observou-se que, não houve atividade em testes antiviral e antitumoral devido sua conformação que possivelmente formam espécies protonada em solução e por isso diminuem a reatividade na interação dos complexos com as células testadas.

Com o intuito de otimizar a atividade biológica desta classe de compostos, o mesmo grupo de pesquisa elaborou uma série de novos compostos de Cu (II) com ligantes análogos, que foram analisados.⁵⁸ Houve a formação de complexos binucleares com a incorporação dos grupos N1,N1-dimetiltiossemicarbazonas ($\text{Me}_2\text{tsc1}$), N1,N2-dimetiltiossemicarbazonas ($\text{Me}_2\text{tsc2}$) e N1-etiltiossemicarbazonas (Ettsc) ao piridoxal, como representados nas Figuras 13 e 14.

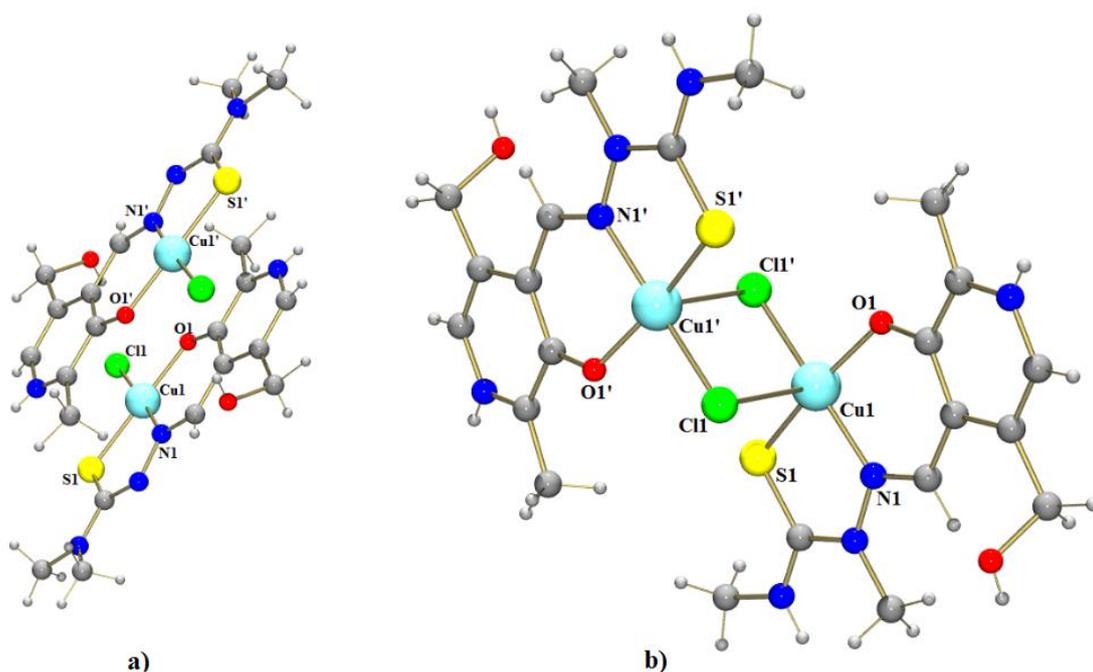


Figura 13. Representação da estrutura cristalina dos complexos (a) $[\text{Cu}(\text{Me2tsc1})\text{Cl}]_2$ e (b) $[\text{Cu}(\text{Me2tsc2})\text{Cl}]_2$.

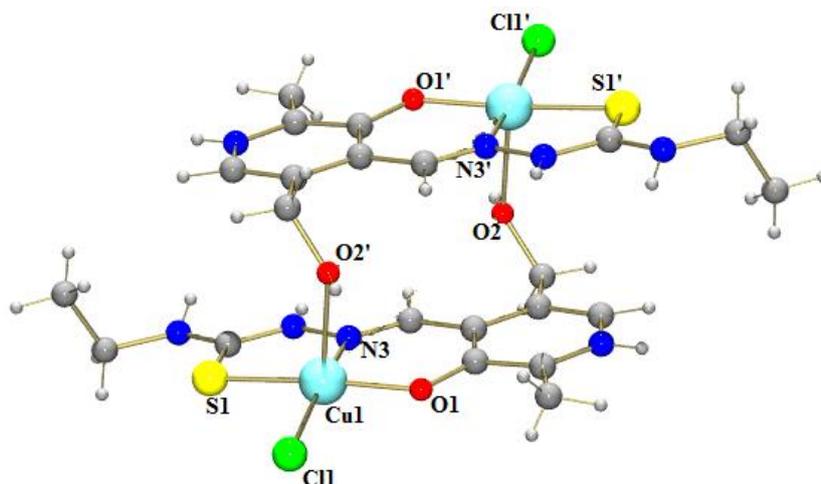


Figura 14. Projeção da estrutura cristalina do complexo $[\text{Cu}(\text{Ettsc})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$.

Nos complexos de Cu (II) sintetizados é observado que eles apresentam forma dimérica, onde os ligantes coordenam-se ao metal de maneira tridentada através dos grupos O-Fenol, N-imina e S-tiol. Através de medidas espectroscópicas na região do infravermelho foi possível observar para estes compostos duas bandas de estiramento C–O (em 1420 e 1469 cm^{-1}) que indicam a formação de complexos diméricos. Os espectros de infravermelho dos ligantes livres comparados aos espectros dos complexos indicaram deslocamentos de bandas específicas, que podem ser atribuídas aos átomos S, N, O, coordenados ao metal, devido a deslocalização eletrônica no ligante coordenado.

Através das análises cristalográficas foi possível observar que o complexo $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{tsc1})\text{Cl}]_2$, cristalizou no sistema cristalino triclinico e grupo espacial $\text{P}\bar{1}$. O centro metálico apresenta geometria quadrado planar e há uma fraca interação entre o átomo de cobre e os átomos de carbono do anel benzênico. As ligações hidrogênio no grupo fenólico com o íon cloreto completam a formação de uma unidade semelhante a um dímero. No complexo $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{tsc2})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ observa-se a cristalização também com grupo espacial $\text{P}\bar{1}$ e geometria pirâmide quadrada, onde compõem a esfera de coordenação o ligante tridentado *NOS* e o íon cloreto ocupando o tetraedro distorcido no plano basal. O complexo $[\text{Cu}(\text{Ettsc})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ cristaliza no sistema cristalino monoclinico e grupo espacial $\text{P}2_1/c$, com geometria pirâmide de base quadrada. O íon Cl^- atua como ponte entre dois átomos de cobre na formação desse dímero.

Foi avaliada a atividade citotóxica dos compostos em três linhagens de células tumorais, U937 (linfoma Histiocítico difuso), CEM (Células Estromais Mesenquimais) e K562 (leucemia mieloide crônica). Observou-se que houve a inibição do crescimento de células tumorais em altas dosagens, porém não apresentaram citotoxicidade significativa dos compostos $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{tsc1})\text{Cl}]_2$ e $[\text{Cu}(\text{Ettsc})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$. Porém o composto $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{tsc2})\text{Cl}]_2\text{Cl}_2$ apresentou alta citotoxicidade em células tumorais com a mesma dosagens dos compostos não efetivos. Isto indica que os substituintes no grupo N-imina diminuem fortemente a atividade biológica de complexos de cobre com esta classe de tiosemicarbazonas. Quanto a atividade citotóxica, o seu efeito na progressão do ciclo celular confirmou que o composto induz à morte celular programada, ou seja, a apoptose das células tumorais avaliadas após um período de 72 horas.

2. OBJETIVOS

2. **Objetivos**

O presente trabalho objetiva a síntese, caracterização e estudo biológico contra células tumorais de compostos derivados das vitaminas B₆ e K₃. A caracterização estrutural será através da técnica de difração de raios X de monocristal de complexos de cobre(II) com ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas. Outras técnicas de análises foram utilizadas com o objetivo de confirmar a estrutura, tais como, espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), infravermelho médio (FT-IR) e ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C. A atividade biológica destes compostos foi avaliada frente a células tumorais S-180, Ehrlich e MCF-7, considerando as células mononucleares do sangue como normais, utilizando técnicas de avaliação *in vitro* para observar o potencial antitumoral dos compostos sintetizados. Sendo assim, têm-se os seguintes objetivos específicos:

- I. Sintetizar ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas, derivados da vitamina B₆, e seus respectivos complexos de cobre (II);
- II. Sintetizar semicarbazonas e hidrazonas, derivados da vitamina K₃;
- III. Caracterizar os novos compostos sintetizados a partir dos métodos de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível, condutância, Ressonância Magnética Nuclear ¹H e ¹³C, e análise elementar CHN, avaliando os modos de coordenação dos ligantes e na formação dos complexos;
- IV. Utilizar técnicas de cristalização dos compostos para a realizar análises de difração de raios X de monocristal e elucidar as estruturas cristalinas e moleculares, bem como, os possíveis arranjos cristalinos formados;
- V. Avaliar estruturalmente os compostos de coordenação sintetizados, verificando os modos de coordenação dos ligantes e do centro metálico;
- VI. Analisar os arranjos tridimensionais formados através das interações intra e intermoleculares na formação de sistemas supramoleculares;
- VII. Avaliar a citotoxicidade dos complexos de cobre(II) através da análise de viabilidade celular pelo método colorimétrico, com o MTT e compará-la aos ligantes precursores em células S-180 e Ehrlich;
- VIII. Analisar a morfologia de morte celular do complexo com melhor desempenho em relação a via de morte e expressão gênica após o tratamento;
- IX. Avaliar a citotoxicidade dos compostos derivados da vitamina K₃ em MCF-7 e PBMC.

3. PARTE
EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados na síntese das Bases de Schiff derivadas de vitaminas foram:

- Piridoxal hidrocloreto – ($C_8H_9NO_3 \cdot HCl$)
- Menadiona – ($C_{11}H_8O_2$)
- Hidrazina mono-hidratada – ($N_2H_4 \cdot H_2O$)
- Dissulfeto de carbono – (CS_2)
- Brometo de alila – (C_3H_5Br)
- 4-Feniltiossemicarbazida – ($C_7H_9N_3S$)
- Tiossemicarbazida – (CH_5N_3O)
- Semicarbazida hidrocloreto – ($CH_5N_3O \cdot HCl$)
- Isoniazida – ($C_6H_7N_3O$)
- Hidróxido de Potássio – (KOH)

Todos esses reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, assim como os sais de cobre (II) utilizados na síntese dos complexos, sendo eles:

- Cloreto de cobre(II) – $CuCl_2$
- Brometo de cobre(II) – $CuBr_2$

Os solventes usados na síntese dos ligantes e dos complexos, nas recristalizações e nas análises de espectroscopia eletrônica foram obtidos da Vetec e encontram-se listados abaixo:

- Metanol – CH_3OH
- Etanol 95% – CH_3CH_2OH
- N,N-dimetilformamida – (CH_3)₂NCOH (DMF)

Os materiais utilizados não necessitaram de purificação prévia, somente de armazenamento e manuseio adequados.

3.2. SÍNTESE DOS AGENTES COMPLEXANTES

3.2.1. Síntese do ligante Piridoxal alilditiocarbazato (H_2L^1)

A síntese do ligante piridoxal alilditiocarbazato (H_2L^1) foi sintetizado por meio de reação de condensação equimolar do reagente comercial piridoxal hidrocloreto (pl) com o alilditiocarbazato (adtc). Este segundo reagente, por sua vez, foi sintetizado através da solubilização de $4,86 \times 10^{-2}$ mL (50,06 mg, 1 mmol) de hidrazina mono-hidratada em 20

mL de etanol. O pH da solução foi alcalinizado por meio da adição de 66,01 mg (1 mmol) de KOH para a desprotonação da amina primária⁶⁵. Após 30 minutos de agitação em banho de gelo, foram adicionados $5,77 \times 10^{-2}$ mL (76,14 mg, 1 mmol) de dissulfeto de carbono para formação do intermediário dtc conforme Figura 15.

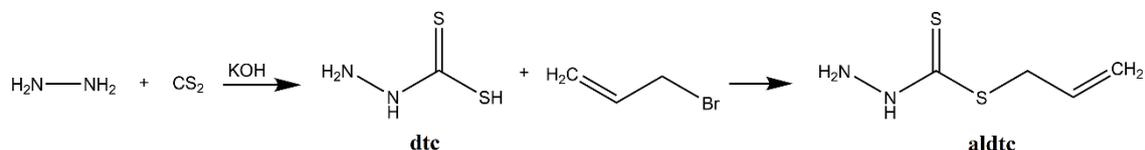


Figura 15. Representação do esquema de síntese do ditiocarbazato aldtc.

A solução obtida permaneceu sob estas condições por mais uma hora, quando foram adicionados $8,85 \times 10^{-2}$ mL (120,98 mg, 1 mmol) de brometo de alila obtendo-se o produto aldtc. Posteriormente, retirou-se o banho de gelo e a solução reacional foi colocada em um sistema de refluxo com agitação e aquecimento a 78 °C. Foram adicionadas ao sistema, de característica incolor, 203,63 mg (1 mmol) do piridoxal hidrocloreto previamente solubilizado em 10 mL de etanol onde houve a formação de uma solução amarela. As condições foram mantidas por 1,5 horas e observou-se a formação de grande quantidade de precipitado amarelo que foi posteriormente filtrado. Esta segunda etapa de reação está representada na Figura 16.

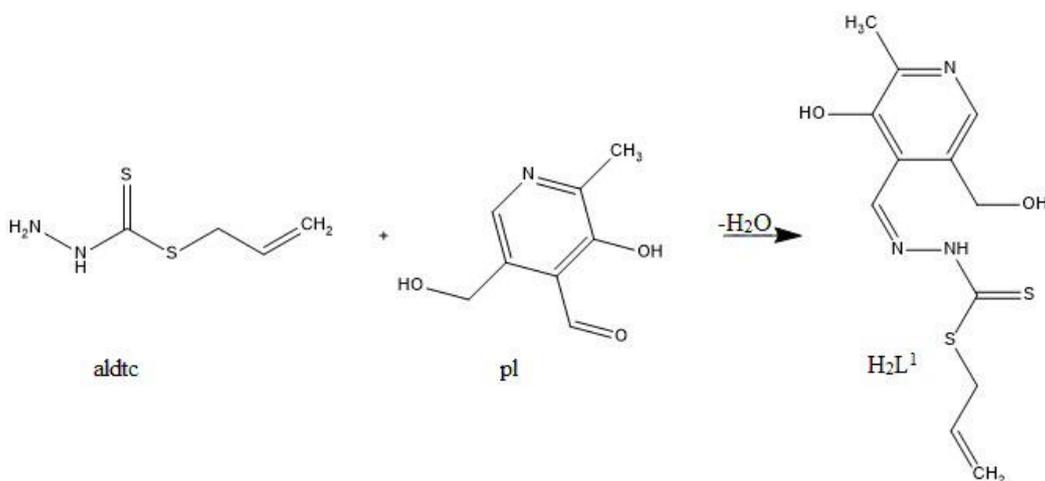


Figura 16. Representação do esquema de síntese do ligante H_2L^1 .

3.2.2. Síntese dos ligantes piridoxal feniltiossemicarbazona (H_2L^2) e piridoxal tiossemicarbazona (H_2L^3)

Os ligantes piridoxal feniltiossemicarbazona (H_2L^2) e piridoxal tiossemicarbazona (H_2L^3), foram sintetizados mediante reação de condensação direta do aldeído com sua respectiva tiossemicarbazida, representadas na Figura 17.

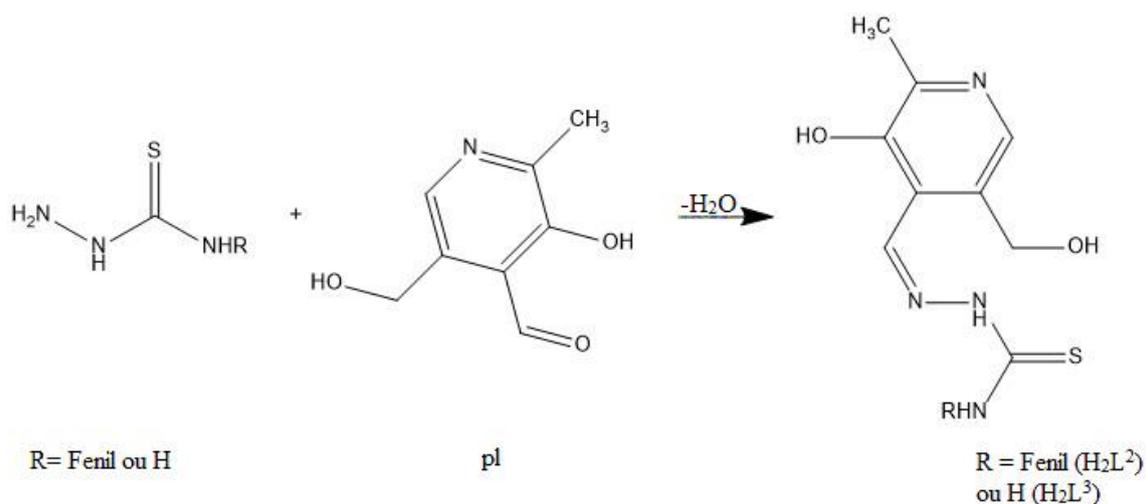


Figura 17. Representação do esquema de síntese dos ligantes H_2L^2 e H_2L^3 .

Foram utilizados 203,63 mg (1 mmol) do piridoxal hidrocloreto em ambas as sínteses, sendo que para formar o ligante H_2L^2 , foram adicionados 167,01 mg (1 mmol) de feniltiossemicarbazida e para o ligante H_2L^3 , foram utilizados 91,12 mg (1 mmol) de tiossemicarbazida ao meio reacional. As condições aplicadas foram iguais em ambas as sínteses, refluxo sob aquecimento de 78 °C e agitação magnética por 2 horas, utilizando álcool etílico como solvente, onde após o resfriamento da solução foi observado a formação de um precipitado amarelo que foi separado por filtração.

3.2.3. Síntese dos ligantes menadiona semicarbazona (K_{3sz}) e menadiona isoniazida (K_{3iz})

Os ligantes menadiona semicarbazonas (K_{3sz}) e menadiona isoniazida (K_{3iz}) foram sintetizados através da reação de condensação direta do aldeído com sua respectiva tiossemicarbazida, conforme representado na Figura 18.

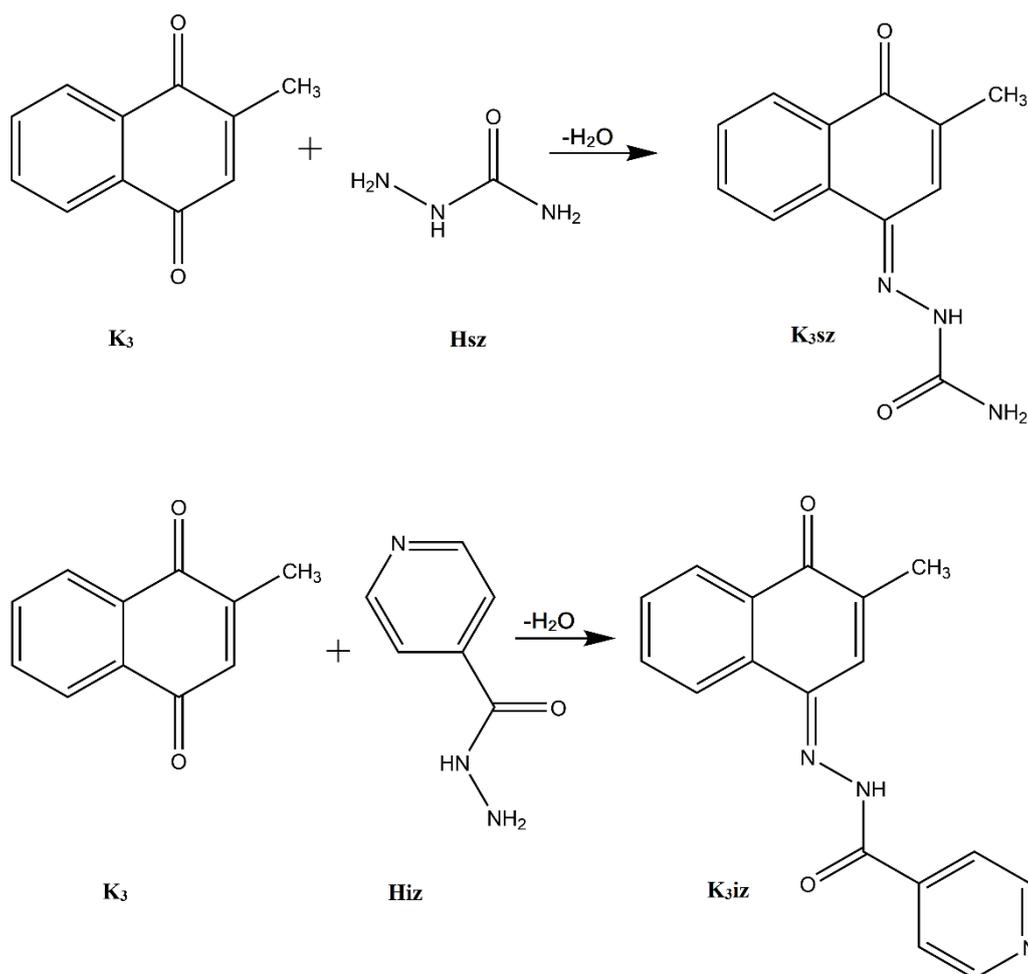


Figura 18. Representação do esquema de síntese dos ligantes K₃sz e K₃iz.

Foram utilizados 203,63 mg da menadiona 172,2 mg (1 mmol) de K₃ em ambas as sínteses, sendo que para formar o K₃sz, foram adicionados 111,53 mg (1 mmol) de semicarbazida hidrocloreto e para o ligante K₃iz foram adicionados 137,2 mg (1 mmol) de isoniazida ao meio reacional. As condições aplicadas foram semelhantes em ambas as sínteses, com sistema de refluxo sob aquecimento a 80°C e agitação magnética por 2 horas, utilizando-se álcool etílico como solvente. Após três semanas, foram obtidos cristais de cor amarela por evaporação lenta do solvente da solução mãe, em temperatura ambiente, 25 °C. Para o composto K₃sz (229,24 g/mol) = Rendimento: 210,32 mg (91%). Ponto de Fusão: 212°C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 62,33 (63,12); H 5,67 (4,89); N, 18,17 (17,40). Para o composto K₃iz (291,10 g/mol) = Rendimento: 268,36 mg (92%). Ponto de Fusão: 231 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 69,61 (69,12); H, 5,15 (4,99); N, 14,33 (13,97).

3.3. SÍNTESE DOS COMPLEXOS

3.3.1. Síntese dos complexos cloro(piridoxal-aliloditiocarbazato)cobre(II) monohidrato, $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1) e bromo(piridoxal-aliloditiocarbazato) cobre(II) monohidrato, $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2).

Dissolveu-se o ligante H_2L^1 29,7mg (0,1 mmol) em 5 mL de metanol e 13,45mg (0,1 mmol) de CuCl_2 ou 22,34mg (0,1 mmol) de CuBr_2 , ambos solubilizados em 5mL de metanol e foram adicionados a um balão de fundo redondo (25 mL). A mistura permaneceu sob refluxo durante 3 horas. Houve a formação de precipitado escuro verde em meio uma solução verde, que foi resfriada em temperatura ambiente para maior precipitação do produto. O precipitado foi separado por filtração. Após três semanas foram obtidos cristais verdes a partir da evaporação lenta de solvente da solução mãe.

3.3.2. Síntese dos complexos cloro(piridoxal-feniltiossemicarbazona)cobre(II) monohidrato, $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Cl}]\cdot\text{dmf}$ (3) e bromo(piridoxal-feniltiossemicarbazona) cobre(II) monohidrato, $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{dmf}$ (4).

Dissolveu-se o ligante H_2L^2 31,65mg (0,1 mmol) em 5 mL de metanol em um balão e a esta solução adicionou-se 13,45 (0,1 mmol) de CuCl_2 ou 22,34mg (1 mmol) de CuBr_2 , solubilizado em 5mL de metanol, onde a mistura permaneceu sob refluxo durante 3 horas. Houve a formação de precipitado verde escuro em meio uma solução verde, que foi resfriada em temperatura ambiente para maior precipitação do produto. Após o resfriamento o precipitado foi filtrado. O produto foi recristalizado em DMF e após 4 semanas houve a formação de cristais verdes.

3.3.3. Síntese do complexo brometo de bromo(piridoxal-tiossemicarbazona)cobre(II) monohidratado, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^3)\text{Br}]\text{Br}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5).

Dissolveu-se o ligante H_2L^3 24,05mg (0,1 mmol) em 5 mL de metanol em um balão e a esta solução adicionou-se 22,34mg (0,1 mmol) CuBr_2 solubilizado em 5mL de metanol, onde a mistura permaneceu sob refluxo durante 3 horas. Houve a formação de precipitado verde escuro em meio uma solução verde, que foi resfriada em temperatura ambiente para maior precipitação do produto. Após três semanas foram obtidos cristais verdes a partir da evaporação lenta de solvente da solução mãe.

3.4 Difração de Raios X

A determinação das estruturas cristalinas e molecular dos compostos sintetizados foi realizada a partir do método de difração de raios X de monocristal, utilizando um difratômetro SMART APEX II CCD (Charge Coupled Device Detector Bruker) com

monocromador de grafite e que possui fonte de radiação de Mo-K α (0,71073Å) a aproximadamente 296 K. Esse equipamento pertence ao Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB).

Os parâmetros de celas unitárias dos compostos foram determinados a partir da coleta de três matrizes, cada uma com doze imagens, as quais foram analisadas e refinadas para que os dados da cela unitária de cada análise fossem obtidos.

A solução das estruturas foi realizada por meio dos métodos diretos, utilizando a opção de refinamento SHELXS-97, e finalizadas pela opção SHELXL-2014 no programa WinGX. A opção de refinamento baseou-se nos quadrados dos fatores estruturais (F^2) e na técnica de matriz completa por mínimos quadrados.⁵⁹⁻⁶¹

A determinação das posições dos átomos não hidrogenóides foi realizada a partir de sucessivas diferenças de Fourier, enquanto o refinamento foi realizado com parâmetros anisotrópicos. O refinamento dos átomos de hidrogênio foi realizado isotropicamente na forma de grupos vinculados geometricamente aos respectivos átomos com os quais faziam ligação.

As ilustrações representando as estruturas cristalinas e as celas unitárias dos compostos foram feitas utilizando os programas DIAMOND, ORTEP-3 e POV-Ray.^{62,63} Os esquemas gráficos foram feitos no programa ChemDraw⁶⁴.

As informações da coleta de dados e refinamento das estruturas cristalinas dos compostos são apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3. As tabelas com os valores de comprimentos e ângulos de ligação encontram-se ao longo da discussão dos resultados.

Tabela 1. Dados da coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalinas dos compostos (1) e (2).

Composto	(1)	(2)
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₆ ClCuN ₃ O ₃ S ₂	C ₁₂ H ₁₆ Br ₂ CuN ₃ O ₃ S ₂
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	413,39	457,85
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 ₁ /n	P 2 ₁ /n
Parâmetros de cela		
<i>a</i> (Å)	6,759(3)	6,790(5)
<i>b</i> (Å)	18,464(8)	18,567(13)
<i>c</i> (Å)	13,319(6)	13,331(10)
β (°)	100,353(2)	100,842(4)
V (Å ³)	1634,96(13)	1650,7(2)
Z	4	4
Densidade (mg/cm ³)	1,679	1,842
Coeficiente linear de absorção μ (mm ⁻¹)	1,768	4,010
Região de varredura angular θ (°)	1,91 – 27,10	1,90 – 26,60
Índices de varredura h, k, l	-8 ≤ h ≤ 8 -17 ≤ k ≤ 23 -17 ≤ l ≤ 17	-7 ≤ h ≤ 8 -23 ≤ k ≤ 20 -16 ≤ l ≤ 16
Número de reflexões Coletadas	16509	15031
Independentes	3613/ 0 / 206	3442/ 0 / 213
Completeness (%)	99,9	99,7
Método de solução da estrutura	Métodos Diretos	Métodos Diretos
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Programa de refinamento	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)
Critério de observação	[I > 2σ(I)]	[I > 2σ(I)]
Número de parâmetros	201	208
Correção de absorção	Multi-scan T _{mín} = 0,59 T _{máx} = 0,81	Multi-scan T _{mín} = 0,40 T _{máx} = 0,68
F(000)	844	1056
Goodness-of-fit (F ²)	1,049	1,032
Índices de discordância finais	R ₁ = 0,0785 wR ₂ = 0,1612	R ₁ = 0,0469 wR ₂ = 0,1131
Densidade eletrônica residual (e·Å ⁻³)	1,321 (0,481 Å de Cl1)	0,530 (0,898 Å de O3)

Tabela 2. Dados da coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalinas dos compostos (3), (4) e (5).

Composto	(3)	(4)	(5)
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₂₂ ClCuN ₅ O ₃ S	C ₁₈ H ₂₄ BrCuN ₅ O ₄ S	C ₉ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ O ₃ S
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	487,45	549,93	481,66
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	C 2/c	C 2/c	P 2 ₁ /n
Parâmetros de cela			
<i>a</i> (Å)	25.157(13)	24.889(16)	8,234(7)
<i>b</i> (Å)	8.438(6)	10.579(7)	21,183(3)
<i>c</i> (Å)	20.063(11)	16.991(11)	9,094(7)
β (°)	93.178(4)	93.648(3)	113,133(3)
V (Å ³)	4252,3(4)	4252,3(4)	1458,9(3)
Z	8	8	4
Densidade (mg/cm ³)	1,523	1,636	2,193
Coeficiente linear de absorção μ (mm ⁻¹)	1,280	2,896	7,129
Região de varredura angular θ (°)	1,62 - 26,40	1,64 - 26,40	1,92 - 27,13
Índices de varredura h, k, l	-31 ≤ h ≤ 30 -10 ≤ k ≤ 10 -24 ≤ l ≤ 24	-31 ≤ h ≤ 25 -12 ≤ k ≤ 13 -21 ≤ l ≤ 21	-10 ≤ h ≤ 10 -27 ≤ k ≤ 27 -11 ≤ l ≤ 8
Número de reflexões Coletadas	18874	19488	13913
Independentes	4366	42570	3235
Completeness (%)	99,9	99,9	99,9
Método de solução da estrutura	Métodos Diretos	Métodos Diretos	Métodos Diretos
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Programa de refinamento	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)
Critério de observação	[I > 2σ(I)]	[I > 2σ(I)]	[I > 2σ(I)]
Número de parâmetros	282	284	191
Correção de absorção	Multi-scan T _{mín} = 0,82 T _{máx} = 0,93	Multi-scan T _{mín} = 0,3972 T _{máx} = 0,7972	Multi-scan T _{mín} = 0,1685 T _{máx} = 0,4530
F(000)	2008	2232	940
Goodness-of-fit (F ²)	1,027	1,024	1,052
Índices de discordância finais	R ₁ = 0,0515 wR ₂ = 0,1067	R ₁ = 0,0748 wR ₂ = 0,2224	R ₁ = 0,0560 wR ₂ = 0,1615
Densidade eletrônica residual (e·Å ⁻³)	0,518 (0,961 Å de C8)	1,424 (0,354 Å de Cu1)	0,950 (0,755 Å de Br2)

Tabela 3. Dados da coleta de intensidades e do refinamento das estruturas cristalinas dos compostos K3sz e K3siz.

Composto	K ₃ sz	K ₃ siz
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O ₂
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	229,24	291,31
Sistema Cristalino	Triclínico	Triclínico
Grupo espacial	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$
Parâmetros de cela		
<i>a</i> (Å)	10,081(5)	6,861(5)
<i>b</i> (Å)	10,615(5)	12,580(8)
<i>c</i> (Å)	12,323(6)	18,117(13)
<i>α</i> (°)	106,995(3)	79,369(4)
<i>β</i> (°)	95,480(3)	85,299(4)
<i>γ</i> (°)	113,831(2)	76,837(4)
V (Å ³)	1118,69(9)	1495,24(18)
Z	2	2
Densidade (mg/cm ³)	1,361	1,294
Coeficiente linear de absorção μ (mm ⁻¹)	0,096	0,088
Região de varredura angular θ (°)	1,78 – 26,41	1,14 – 25,68
Índices de varredura h, k, l	-12 ≤ h ≤ 12 -13 ≤ k ≤ 13 -15 ≤ l ≤ 15	-8 ≤ h ≤ 8 -15 ≤ k ≤ 15 -22 ≤ l ≤ 21
Número de reflexões Coletadas	20067	23629
Independentes	4579	5661
Completeness (%)	99,5	99,5
Método de solução da estrutura	Métodos Diretos	Métodos Diretos
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Programa de refinamento	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)	SHELXL-2014 (Sheldrick, 2008)
Critério de observação	[I > 2σ(I)]	[I > 2σ(I)]
Número de parâmetros	310	501
Correção de absorção	Multi-scan T _{mín} = 0,9401 T _{máx} = 0,9883	Multi-scan T _{mín} = 0,9634 T _{máx} = 0,9920
F(000)	480	608
Goodness-of-fit (F ²)	1,051	0,898
Índices de discordância finais	R ₁ = 0,0522 wR ₂ = 0,1240	R ₁ = 0,0515 wR ₂ = 0,1267
Densidade eletrônica residual (e·Å ⁻³)	0,251 (0,653 Å de H5a)	0,148 (1,118 Å de O2)

3.5 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FT-IR Varian Cary 640 na região de 4000–400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , pertencente a Central Analítica da UnB (CAIQ-IQ), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) preparadas na proporção aproximada de 1 mg de composto para 100 mg de KBr. As linhas de base dos espectros obtidos foram corrigidas no programa WinBomem Easy de modo a melhorar a visualização dos espectros.

3.6 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível e Condutância

Os espectros de absorção molecular na região do ultravioleta-visível dos ligantes e dos complexos foram obtidos em um espectrofotômetro Agilent HP 8453, utilizando soluções com concentrações de aproximadamente $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, preparadas em dois solventes: Metanol e N,N-dimetilformamida.

A condutância molar dos complexos foram medidas a partir de uma solução $1 \times 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$ de cada complexo metálico em MeOH em temperatura ambiente (25 °C) usando um medidor de condutividade por microprocessador Ion DDS 12DW e uma célula tipo dip com um eletrodo de platina. As análises foram realizadas na Central Analítica da UnB (CAIQ-IQ).

3.7 Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para os ligantes livres foram obtidos a partir de soluções de DMSO- d_6 à temperatura ambiente no equipamento Bruker Avance III HD 600 MHz. Os espectros foram processados com o software *TopSpin 3.2*. Uma função exponencial (LB = 0,15 Hz) foi aplicada previamente à transformada de Fourier com aproximadamente 64 mil pontos, com preenchimento (1x *Zero filling*). Ajustou-se automaticamente o parâmetro de fase de ordem zero e a linha de base com função polinomial de quinta ordem. As análises foram realizadas na Central Analítica da UnB (CAIQ-IQ).

3.8 Ponto de Fusão (p.f.)

A determinação do ponto de fusão dos complexos metálicos e do ligante foi realizada em um aparelho digital MQAPF-302 da Micro Química, pertencente ao laboratório LASIC da UnB.

3.9 Atividade biológica

Os ensaios foram realizados em Goiânia-GO no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, situado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB1) da Universidade Federal de Goiás (UFG) para realização dos ensaios de atividade biológica, em parceria com Profa. Dra. Elisângela Pereira Silveira Lacerda. Também foram realizados ensaios em Barra do Garças-MT, no Laboratório de Imunomodulação e Saúde Materno-Infantil no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, em parceria com a Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório-França.

3.9.1 Linhagens celulares e cultura de células

Células de tumorais de murino Sarcoma-180 (S-180) da *American Type Culture Collection* (ATCC®# TIB-66) e tumor de carcinoma de mama murinho, Ehrlich (ATCC®# TIB-66), foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco®, Life Technologies), 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina. As culturas foram incubadas em incubadora umidificada (Thermo Scientific) a 37 °C com 5% de CO₂, de acordo com os métodos descritos por Lima et al.⁶⁶ As células de controle foram expostas e tratadas a uma concentração final de 0,1% de DMSO (não citotóxica).

Células de câncer de adenocarcinoma mamário (MCF-7) foram obtidas da (ATCC, EUA). As células foram mantidas em culturas de monocamada em frascos de cultura plástica de 75 cm² em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), penicilina (20 U/ml) e estreptomicina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) a 37 ° C numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂. As células foram subcultivadas a cada 5 ± 2 dias.

Para as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram coletadas amostra de 15mL de sangue de 24 homens clinicamente saudáveis, variando de 18 a 35 anos de idade. Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de entrarem no estudo, que foi aprovado pelo comitê de ética local do Campus Araguaia da Universidade Federal de Mato Grosso [Protocolo Número CAAE: 62417016.6.000.5587]. As amostras de sangue foram coletadas e heparinizadas em alíquotas de 25 U/mL e fracionadas por gradiente de densidade Ficoll-Paque, densidade 1,077 g / L; centrifugação 160g; 30 min (Pharmacia, Upsala, Suécia). Este procedimento resultou na preparação de fagócitos mononucleares puros (MN), analisados morfológicamente por microscopia de luz. Os fagócitos MN purificados foram ressuspensos

independentemente em meio de cultura 199 isento de soro a uma concentração final de 2.10^6 células mL^{-1} .

3.9.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

Os efeitos citotóxicos dos 7 compostos foram avaliados usando o ensaio colorimétrico com o brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol) - 2,5 difeniltetrazol (MTT) com células Ehrlich e S-180 para os compostos derivados da vitamina B6, e os composto derivados da vitamina K3 foram avaliados frente às células MCF-7 e PBMC. Inicialmente, $1,0 \times 10^5$ de células Ehrlich, S-180, MCF-7 e PBMC foram colocadas separadamente em placas de uma placa de cultura de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações dos compostos (0,2-200 μM) por 48 h ou (2-200 μM) por 24h. Após este tratamento, 10 μl de MTT (5 mg mL^{-1}) foram adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas a 37 °C por mais 3 horas. Os cristais de formazan púrpura foram dissolvidos em 50 μL com a seguinte solução [40% (v/v) de dimetilformamida (DMF), 2% (v/v) de ácido acético glacial e 16% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) em pH = 4,7]. Depois disso, a absorbância foi determinada em 545 nm usando um leitor de microplacas Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, EUA). A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$V = \left(\frac{Abs_t}{Abs_c} \right) \times 100$$

onde V, Abs_t e Abs_c são, respectivamente, porcentagem de viabilidade celular (%) obtida de três experimentos independentes, cada um feito em triplicatas, absorbância dos poços tratados e absorbância dos poços de controle. A determinação da metade (50%) da concentração inibitória máxima (IC_{50}) foi obtida a partir de curvas dose-resposta usando o *software* GraphPad Prism 4.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores IC_{50} obtidos a partir do ensaio MTT foram utilizados como referência para testes adicionais.

3.9.3 Avaliação de apoptose e/ou necrose Avaliação de apoptose e necrose por coloração com Hoechst/PI

As células tumorais de Ehrlich e S-180 foram tratadas com complexo (5) nas concentrações de IC_{50} , comparando com um grupo controle sem tratamento. Após 24h, as células foram coletadas e lavadas com PBS para a densidade de células 2.10^5 células mL^{-1} . As células foram suspensas em solução de Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e iodeto de

propídio ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) onde foram incubadas a 37°C por 10 min na ausência de luz. As lâminas foram observadas usando um microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha). Pelo menos 300 células foram quantificadas em cada lâmina e cada experimento foi feito em duplicata. As porcentagens de células apoptóticas (apoptose precoce e tardia) e necróticas foram determinadas a partir do número total de células, sendo observadas com os seguintes aspectos: a) cromatina azul viável com estrutura organizada, b) apoptose precoce - cromatina azul brilhante altamente condensada ou fragmentada, c) tardia apoptose - cromatina rosa brilhante altamente condensada ou fragmentada, e d) cromatina rosa - necrose com estrutura organizada.⁶⁷⁻⁶⁹

3.9.4 Avaliação da expressão Genica

As células Ehrlich e S-180 foram tratadas respectivamente com o complexo (5) durante 3 h, numa concentração de $3 \cdot 10^6$ células (concentração de IC_{50}). A extração total do RNA, foi realizada utilizando o kit PureLink® RNA Mini Kit (Applied Biosystems, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA foram medidas utilizando medidas espectroscópicas com o Espectrofotetro Nano-Drop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technology, Wilmington, DE). Além disso, o RNA com densidade ótica (DO) 260/280 e 260/230 $> 1,8$ com relação a quantidade e qualidade foram analisados usando o bioanalisador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e o RNA 6000 Nano Kit, seguindo as instruções do fabricante. Apenas o RNA de alta qualidade ($\text{RIN} \geq 7$) foi usado para as etapas subsequentes.

O RNA ($2 \mu\text{g}$) foi então transcrito reversamente em cDNA usando o kit de alta capacidade RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, EUA) em uma solução reológica de reação com $20 \mu\text{L}$ de acordo com as instruções do fabricante. Como relatado em 2014 por Lima et al.⁷⁰, foi realizado um sistema de PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo real de fluorescência (RT-qPCR) com corante verde SYBR (LGC Biotechnology, UK) por método comparativo Ct para os genes *Bax*, *Casp3*, *Casp9* e *TP53*. Todas as amplificações foram realizadas em triplicata em um sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems).

O RNA ribossômico 18S (Qiagen - Catalog Number PPM72041A) e água ultra-pura foram utilizados, respectivamente, como gene de referência e controle negativo em todas as reações. As sequências de primers são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências de primers utilizados para o ensaio real time RT-qPCR.

Gene	Sequência do <i>Primer</i>	Comprimento amplificado (bp)
<i>Bax</i>	F-5'GCTACAGGGTTTCATCCAGG-3'	113
	R-5'GGAGACACTCGCTCAGCTTC-3'	
<i>Casp3</i>	F-5'GGAGCTTGGAACGCTAAGAA-3'	112
	R-5'GTCCACTGACTTGCTCCCAT-3'	
<i>Casp8</i>	F5'AGTACTCGGCCACAGGTTA-3'	137
	R5'TGGGATGTAGTCCAAGCACA-3'	
<i>Casp9</i>	F-5'TAGCTGGAACACTGGGCATTGAGT-3'	146
	R-5'AACATACCCATCGGTGCATTTGGC-3'	
<i>TP53</i>	F-5'TGGAAGACTCCAGTGGGAAC-3'	87
	R-5'TCTTCTGTACGGCGGTCTCT-3'	

3.9.5 Análise da ativação de caspase 3

A medição direta da atividade da Caspase 3 foi realizada utilizando o Ensaio de Protease ApoTargetCaspase 3 (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Após tratamento com complexo (5) com a concentração referente ao valor de IC₅₀ durante 24 h, as células foram lisadas com tampão de lise celular gelado. A concentração de proteína foi então medida usando o BSA Protein Assay Kit (BioRad). Uma alíquota do extrato de proteína (200 µg) foi misturada com 50 µL de tampão 2X suplementado com ditioneitol (DTT) 10 mM e os substratos de DEVD-pNA (caspase 3). As misturas foram então incubadas durante 2 h a 37 °C. Subsequentemente, a formação de p-nitroanilida nas amostras foi medida utilizando um leitor de microplacas ELISA no comprimento de onda referente a 405 nm. O aumento nas atividades da caspase 3 foi determinado pela comparação dos resultados com o controle.

3.9.6 Análise Estatística

Os resultados estatísticos foram expressos como a média ± desvio padrão das médias obtidas a partir de experimentos independentes em triplicatas. Os gráficos foram gerados com o software Prism (GraphPad). Testes de correlação foram realizados para determinar os efeitos da concentração do complexo na linha celular do tumor. A

significância estatística das diferenças ($p < 0,05$), em comparação com as células não tratadas utilizadas como controle, foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste de Tukey ou Dunnett, quando aplicável, Teste T para RT-qPCR e Mann-Teste U de Whitney para Medição da atividade da Caspase 3. A concentração que produz um efeito inibitório de 50% no parâmetro avaliado (IC_{50}) foi obtida graficamente a partir das curvas de dose-resposta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos das análises estruturais e por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível realizadas para sete compostos que tiveram suas estruturas cristalinas e moleculares inéditas determinadas por difração de raios X de monocristal, sendo cinco complexos de cobre(II), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^2)\text{Cl}]\cdot\text{dmf}$ (3), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^2)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{dmf}$ (4) e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^3)\text{Br}]\text{Br}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5), além de duas bases de Schiff derivadas da vitamina K₃, K_{3sz} e K_{3siz}. Também serão apresentadas as caracterizações espectroscópicas por Ressonância Magnética Nuclear dos compostos orgânicos precursores dos complexos, além da caracterização espectrométrica. Para a avaliação dos compostos em meio biológico foi realizado o teste de viabilidade celular IC₅₀, em células tumorais Sarcoma-180, Ehrlich e MCF7. Contudo, também foram realizadas as análises morfológicas para o composto (5), para avaliar as possíveis vias de morte das células, com os testes de apoptose e expressão gênica.

4.4 Caracterização dos ligantes Derivados da Vitamina B6

Os compostos derivados da molécula do piridoxal, podem existir em duas possibilidades tautoméricas, sendo a estrutura iônica, considerada um oxo-zwitterion onde o nitrogênio da piridina é protonado e o oxigênio do fenol é desprotonado, e a estrutura neutra, como representados na Figura 19.³⁷. O produto da reação de condensação entre o piridoxal (3-hidroxi-5-hidroximetil-2-metilpiridina-4-carbaldeído) com ditiocarbazato ou tiossemicarbazida produziu os ligantes tridentados que comumente são relatados nas formas neutra e iônica.⁷¹⁻⁷⁴

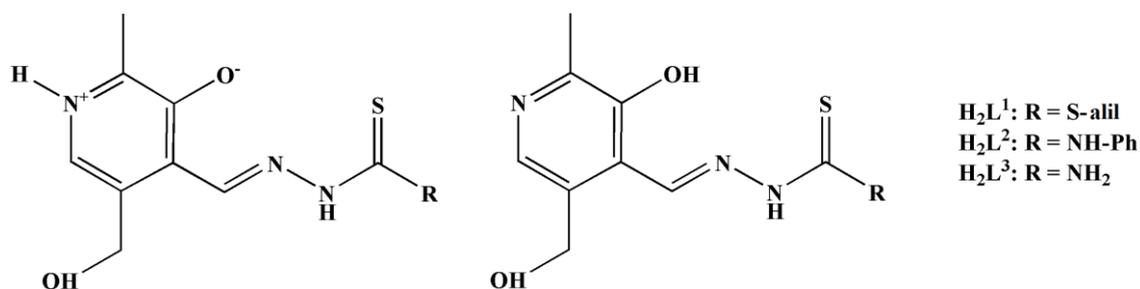


Figura 19. Formas zwitteriônicas (esquerda) e tautoméricas neutras (direita) para os ligantes de derivados de piridoxal.

Contudo, em solução e no estado sólido, a forma zwitteriônica é predominante nos complexos metálicos com derivados de piridoxal e isso é apoiado por estudos de RMN e análise de raios X.⁷⁵

São representados no Apêndice 1 os esquemas de numeração do ditiocarbazato e tiossemicarbazonas derivados do piridoxal, empregados nas atribuições dos sinais na análise de caracterização espectroscópica por ressonância magnética nuclear. Os valores de deslocamento de químico referentes ao ^1H e ^{13}C , para estes compostos são característicos de bases de Schiff e indicam o comportamento destes compostos em solução com temperatura 20 °C. Na Tabela 5, estão apresentados os principais sinais de deslocamento químico referentes aos átomos de C e H dos compostos analisados.

Tabela 5. Sinais de RMN ^1H e ^{13}C .

Composto	^{13}C NMR, δ (ppm)					
	-C=S	-C=N	C-OH	-S-CH ₂	Carbono Arom.	-NH
H₂L¹	197,1	164,5	148,6	36,2	142,0 - 125,3	9,4
H₂L³	154,0	152,5	151,8	–	142,9 - 119,9	11,6 9,5
H₂L³	154,5	151,8	148,7	–	142,6 - 135,4	12,7 11,3 9,0
Composto	^1H NMR, δ (ppm)					
	-OH	-CH=N-	-S-CH ₂	Próton Arom.		
H₂L¹	8,8	8,3	4,8 - 4,8	7,2 - 7,1		
H₂L³	8,4	8,1	–	7,5 - 7,5 7,3 - 7,2		
H₂L³	8,8	8,5	–	8,5 - 8,2		

Com os espectros de ^1H e ^{13}C , é possível observar o sinal de deslocamento químico característico da maioria dos átomos de carbono e hidrogênio além de suas respectivas conformações. Não foi realizado a integração dos sinais, devido a baixa intensidade e algumas sobreposições. Os deslocamentos químicos mais altos no espectro de ^1H , são atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio, sendo que este se encontra em um momento de desblindagem favorável. Entretanto no espectro de ^{13}C os deslocamentos químicos de maior intensidade foram atribuídos ao carbono de tionila, presente nos ligantes ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas. Portanto, todos os sinais atribuídos possuem aproximações de dados fundamentais da ressonância magnética nuclear, e também de estruturas semelhantes já reportadas.⁷⁵ Os resultados de rendimento, ponto de fusão e análise elementar obtidos para estes compostos foram: (H₂L¹) = Rendimento: 256,3 mg (86%). Ponto de Fusão: 184 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 48,46 (49,01); H 5,08 (4,99); N, 14,13 (14,39). (H₂L²) = Rendimento: 304,3 mg (96%). Ponto de Fusão: 132°C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 56,95 (57,68); H

5,10 (4,75); N, 17,70 (18,13). (H_2L^3) = Rendimento: 224,1 mg (93%). Ponto de Fusão: 150°C. Análise Elementar % teórica (%experimental): C, 44,99 (45,62); H 5,04 (4,87); N, 23,32 (23,40).

4.5 Complexos Derivados da Vitamina B6

Da reação de condensação entre o piridoxal e o alilditiocarbazato foi possível a obtenção do agente complexante piridoxal ditiocarbazato (H_2L^1) e a partir deste foi possível sintetizar dois complexos de cobre(II), sendo eles, $[Cu(HL^1)Cl] \cdot H_2O$ (1) e $[Cu(HL^1)Br] \cdot H_2O$ (2).

A partir da reação de condensação entre o piridoxal e o feniltiossemicarbazida ou tiossemicarbazida, obtêm-se os ligantes piridoxal feniltiossemicarbazona (H_2L^2) e piridoxal tiossemicarbazona (H_2L^3). Os complexos $[Cu(HL^2)Cl] \cdot dmf$ (3) e $[Cu(HL^2)Br] \cdot H_2O \cdot dmf$ (4) foram sintetizados a partir da reação de complexação entre razões equimolares do ligante piridoxal feniltiossemicarbazona e os sais de cobre(II), $CuCl_2$ e $CuBr_2$, respectivamente. O complexo $[Cu(H_2L^3)Br]Br \cdot H_2O$ (5), foi sintetizado a partir da reação de complexação entre razões equimolares do ligante piridoxal tiossemicarbazona (H_2L^5) e $CuBr_2$. Os valores de condutividade molar encontrado para os complexos (1-4) estão entre 82,2 e 88,4 $\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$, indicando que são complexos metálicos não eletrólitos. No entanto, observa-se claramente que o complexo 5 é um composto eletrólito, com condutividade molar de 186,4 $\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$, devido ao íon cloreto e ao complexo catiônico.⁷⁶

Na Figura 20 está representado um esquema reacional das sínteses realizadas para obtenção dos complexos 1-5.

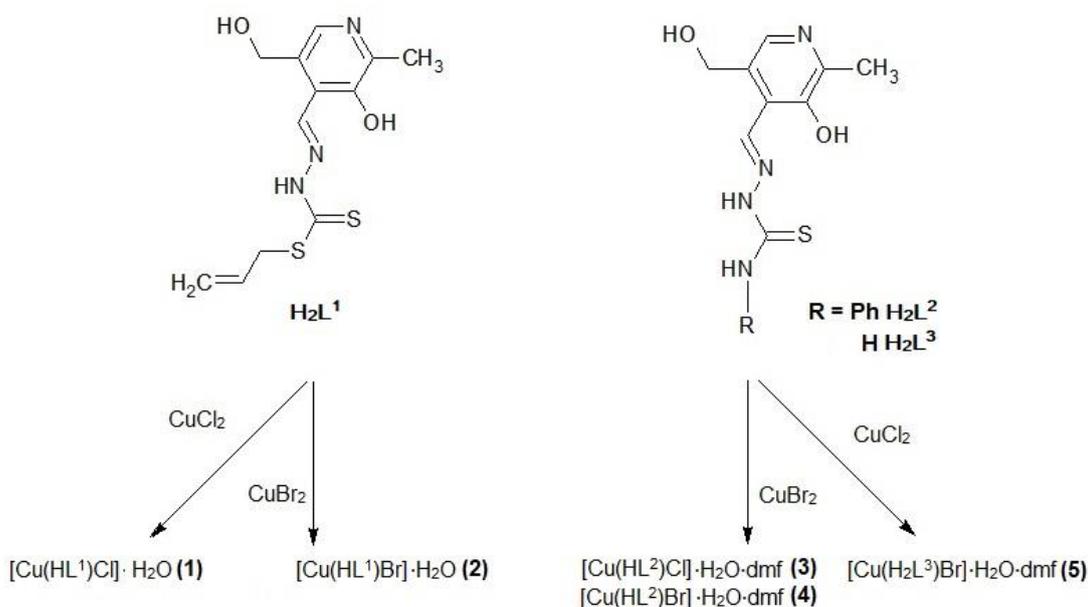


Figura 20. Esquema da síntese dos complexos (1-5).

Os resultados de rendimento, ponto de fusão, análise elementar e condutividade molar dos complexos sintetizados foram: Para o complexo (1) (413,39 g/mol) = Rendimento: 260 mg (62%). Ponto de Fusão: 242 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 34,54 (34,87); H 3,87 (3,96); N, 10,55 (10,16). Condutividade molar em solução (10^{-3} mol L⁻¹, em MeOH): 83,6 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Para o complexo (2) (457,85 g/mol) = Rendimento: 398 mg (87%). Ponto de Fusão: 253 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 31,54 (31,48); H 3,87 (3,52); N, 9,49 (9,18). Condutividade molar em solução (10^{-3} mol L⁻¹, em MeOH): 82,2 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Para o complexo (3) (487,45 g/mol) = Rendimento: 385 mg (79%). Ponto de Fusão: 277 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 44,27 (44,35); H 4,82 (4,55); N, 14,46 (14,37). Condutividade molar em solução (10^{-3} mol L⁻¹, em MeOH): 86,8 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Para o complexo (4) (549,93 g/mol) = Rendimento: 445 mg (81%). Ponto de Fusão: 282 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 39,09 (39,31); H 4,72 (4,40); N, 13,16 (12,73). Condutividade molar em solução (10^{-3} mol L⁻¹, em MeOH): 88,4 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Para o complexo (5) (481,66 g/mol) Rendimento: 380 mg (79%). Ponto de Fusão: 231 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 22,42 (22,44); H 2,48 (2,93); N, 11,54 (11,63). Condutividade molar em solução (10^{-3} mol L⁻¹, em MeOH): 186,4 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹.

4.5.1 Análise estrutural dos complexos $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Cl}]\cdot\text{dmf}$ (3), $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{dmf}$ (4) e $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^3)\text{Br}]\text{Br}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5)

Os dados obtidos na coleta de intensidades e refinamento da estrutura dos complexos (1-2 e 5) indicam que estes compostos cristalizam no sistema cristalino monoclinico e grupo espacial $P2_1/n$, referência número 11 da *International Tables for Crystallography*⁷⁷ e simetria de Laue $2/m$. Entretanto a análise de difração de raios X indica que os complexos (3) e (4) cristalizam com o sistema cristalino monoclinico e grupo espacial $C2/c$, referência número 15 da *International Tables for Crystallography*⁷⁷ e simetria de Laue $2/m$.

As Figuras 21, 22 e 23 representam as projeções ORTEP dos compostos (1-5) respectivamente, com a numeração de todos os átomos não hidrogenóides.

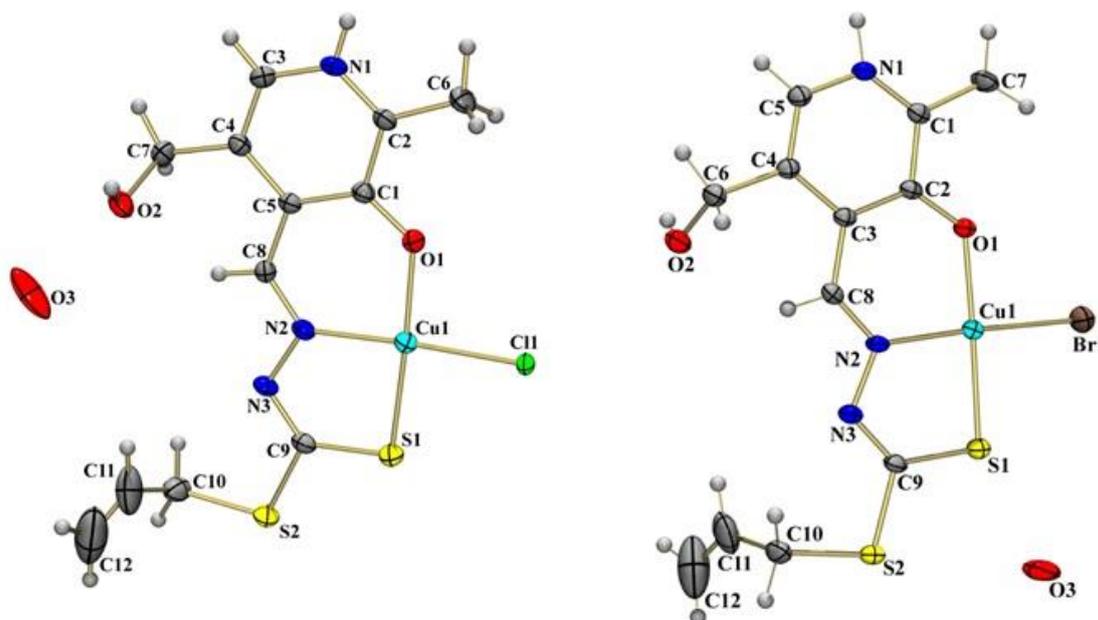


Figura 21. Projeção ORTEP dos compostos $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.

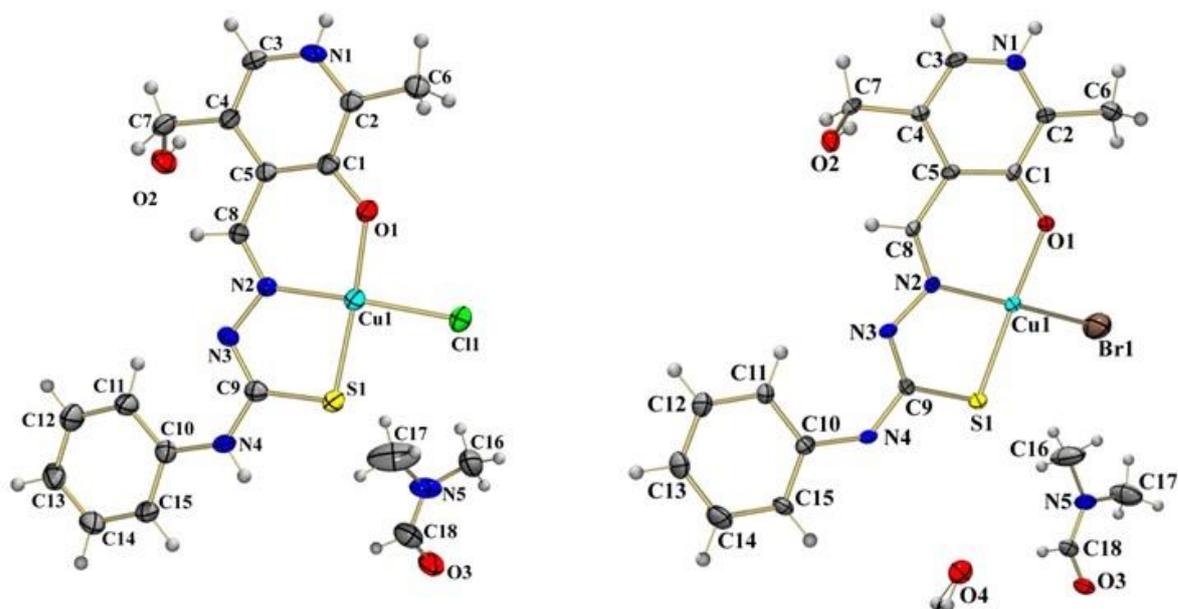


Figura 22. Projeção ORTEP dos compostos $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Cl}]\cdot\text{dmf}$, $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{dmf}$. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.

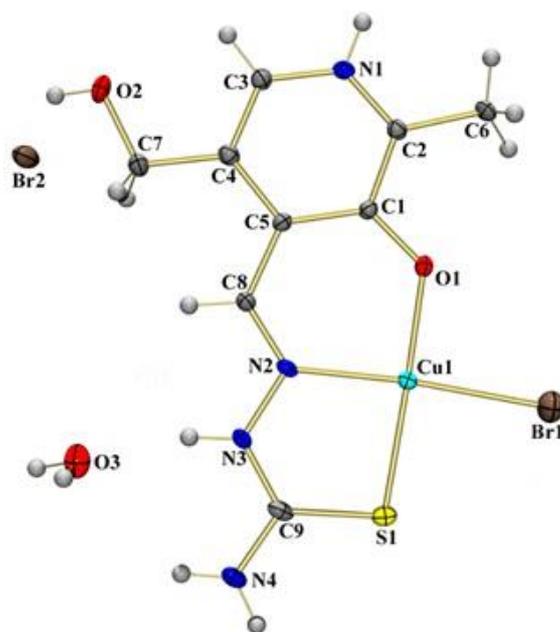


Figura 23. Projeção ORTEP do composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^3)\text{Br}]\text{Br}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.

Em solução e no estado sólido, a forma de zwitterion é predominante nos complexos metálicos com ligantes derivados do piridoxal, sendo que isso é reportado por estudos de RMN e análise de raios X.⁷⁵ Neste trabalho, as bases de Schiff nos complexos (1–5) atuam como ligantes na conformação zwitteriônica, estando coordenadas através dos átomos doadores de *ONS* nas formas tautoméricas tioladas. Além disso, estrutura molecular

de (1) e (3) mostra a coordenação do átomo de cobre (II) com um íon cloreto e nos complexos (2, 4 e 5) coordenados a um íon brometo. Os ligantes comportam-se como zwitterions carregados com carga negativa ao grupo fenol nos complexos (1 a 4) apresentando complexos neutros, porém no complexo (5) o ligante está com conformação de zwitterion neutro produzindo conseqüentemente um complexo catiônico. O complexo (5) possui na estrutura de seu ligante, o átomo N3 protonado, devido a deslocalização eletrônica presente no complexo, pois não é observado este comportamento nas estruturas derivados do grupo fenil⁷⁸.

Os compostos (1) e (2) são isoestruturais, com a presença de uma molécula de água em suas unidades. Cada átomo de Cu(II) encontra-se coordenado a uma molécula do ligante HL¹ atuando de forma tridentada e aniônica.

Os complexos (3), (4) e o composto [CuCl(piridoxalN4-phenltiosemicarbazona)], reportado por Subarkhan et al.⁷⁹ são isoestruturais, porém observa-se a presença de uma molécula de N,N-dimetilformamida no retículo cristalino dos complexos (3) e (4), entretanto neste último possui ainda uma molécula de água, onde estas moléculas atuam como solvente de cristalização.

O complexo (5) apresenta em sua unidade assimétrica o átomo central coordenado a uma molécula do ligante H₂L³ com a conformação de ligação tridentado com a mesma seqüência de átomos ligados *ONS*, além de um íon brometo que completa a esfera de coordenação. Observa-se ainda a presença de uma molécula de água que atua como solvente de cristalização.

Nos complexos as ligações duplas C8=N2 e N3=C9 podem ser atribuídas com a configuração *E*, devido aos ângulos diedrais entre 122° e 117° respectivamente..⁸⁰

Nos complexos (**1-5**), o centro metálico encontra-se coordenado aos átomos O1, N2, S1 e C11 ou Br1, com os respectivos comprimentos de ligação Cu1-S1 entre 2,210(2) e 2,256(2) Å, Cu1-O1 entre 1,903(5) e 1,931(3) Å e Cu1-N2 de 1,955(3) a 1,974(7) Å. Estes complexos apresentam um número de coordenação igual a quatro além da geometria quadrado planar levemente distorcida. Esta distorção pode ser observada analisando-se os valores dos ângulos de ligação O1-Cu1-N2, O1-Cu1-C11 e O1-Cu1-Br1 que estão entre 85,15° e 92,69° além dos ângulos de ligação basais O1-Cu1-S1, C11-Cu1-N2 e Br1-Cu1-N2 que são inferiores a 176,57° e que apesar de apresentarem variações, ainda estão de acordo com outros complexos de cobre(II) que apresentam a mesma geometria e foram reportados na literatura⁸¹, sendo que dos compostos reportados os ângulos de ligação observados para um complexo de Cu(II) tetracoordenado, se apresentaram entre

85,77° e 105,22° e em seu plano basal os ângulos foram inferiores a 145,91°. A Tabela 6 apresenta alguns valores de ângulos e comprimentos de ligação selecionados para os complexos (1-5).

Tabela 6. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados para os complexos 1-5. Os desvios encontram-se entre parênteses.

Comprimentos de ligação (Å)					
Ligação	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Cu(1)–O(1)	1,931(3)	1,914(3)	1,907(3)	1,910(6)	1,903(5)
Cu(1)–N(2)	1,969(4)	1,964(4)	1,955(3)	1,974(7)	1,966(6)
Cu(1)–S(1)	2,240(14)	2,232(15)	2,215(13)	2,210(2)	2,256(2)
Cu(1)–Cl(1)	2,283(12)	-	2,275(12)	-	-
Cu(1)–Br(1)	-	2,360(9)	-	2,364(16)	2,363(13)
S(1)–C(9)	1,721(5)	1,730(5)	1,735(4)	1,738(8)	1,688(8)
O(1)–C(1)	1,275(6)	1,295(6)	1,307(4)	1,320(10)	1,300(8)
N(2)–N(3)	1,404(5)	1,403(5)	1,382(4)	1,367(9)	1,370(7)
C(8)–N(2)	1,299(6)	1,291(6)	1,290(5)	1,300(10)	1,285(9)
S(2)–C(9)	1,745(5)	1,739(5)	-	-	-
Ângulos de ligação (°)					
Ângulo	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
O(1)–Cu(1)–S(1)	175,97(11)	176,33(11)	174,41(10)	169,70(2)	170,12(17)
N(2)–Cu(1)–Cl(1)	176,57(12)	-	172,80(10)	-	-
N(2)–Cu(1)–Br(1)	-	176,37(12)	-	170,70(2)	174,65(17)
O(1)–Cu(1)–N(2)	90,93(15)	91,47(15)	92,61(12)	91,80(3)	92,3(2)
N(2)–Cu(1)–S(1)	85,67(12)	85,53(12)	85,16(10)	85,70(2)	86,13(16)
O(1)–Cu(1)–Cl(1)	91,58(10)	-	90,89(9)	-	-
O(1)–Cu(1)–Br(1)	-	91,51(10)	-	91,33(18)	92,06(14)

S(1)–Cu(1)– Cl(1)	91,90(5)	-	91,91(5)	-	-
S(1)–Cu(1)– Br(1)	-	91,57(4)	-	92,69(8)	89,08(6)

Em 2016, Nanjundan e colaboradores⁸², elucidaram a estrutura cristalina de um complexo de cobre(II) com o ligante derivado do S-alilditiocarbazato, em que a unidade assimétrica deste complexo é semelhante aos complexos (1) e (2), entretanto o complexo cristalizou-se na conformação tautomérica tiona, com os átomos de N-azometina de S-tiona coordenado ao metal. O comprimento da ligação C–S (1,739 Å) indica que é uma ligação simples e a ligação C–N (1,287 Å) é intermediária entre uma ligação simples e dupla, indicando a deslocalização eletrônica no grupo N–C–S do ligante. Contudo os ângulos de ligação entre os ligantes e o metal, estão próximos de 101,62° e 101,98° na esfera de coordenação indicando uma geometria quadrado planar, levemente distorcida, assim como nos complexos (1) e (2) apresentados neste estudo.

No ano de 2015, Mandal e colaboradores⁸³, reportaram a estrutura cristalina de complexos de cobre(II) com ligantes piridoxal metiltiossemicarbazona que apresenta uma estrutura semelhante a estrutura cristalina dos complexos (3) e (4). É possível comparar os dados estruturais dos complexos e observar que os comprimentos das ligações que formam o poliedro de coordenação para os átomos de cobre apresentam valores similares.

No ano de 2014, Manikandan e colaboradores⁵¹, publicaram a estrutura cristalina de uma série de complexos de cobre(II), dentre eles com o ligante piridoxal tiossemicarbazona, sendo uma delas muito semelhante a do complexo (5), onde o que diferencia é simplesmente a presença de uma molécula água de cristalização. É possível verificar que ao compararmos os dados da análise de difração de raios X dos complexos os comprimentos das ligações que formam o poliedro de coordenação para os átomos de cobre apresentam valores muito similares. Também é evidenciado a característica desta classe de complexos a reproduzir estruturas semelhante a dímeros, através de ligações de hidrogênio intermolecular.

Analisando a estrutura cristalina e molecular dos complexos (1-5), observa-se uma deslocalização da densidade eletrônica na cadeia, onde os ângulos de ligação diedral entre S–C=N–N=C é observada com discrepância entre os comprimentos das ligações dupla e simples, indicada pelos comprimentos das ligações C9–N3 em torno de 1,293(6) e 1,337(9) Å e o grupo tiolato com comprimento de ligação C9–S1 estão entre 1,688(8) e

1,738(8) Å. A distorção no poliedro de coordenação do centro metálico pode estar associada à rigidez do ditiocarbazato ou tiosemicarbazona, com os ângulos O1–Cu1–S1 (175,97° – 169,70°) e N2–Cu1–X (176,57° – 170,70°), sendo X = Cl ou Br, entretanto os valores estão próximos do esperado que é esperado, ou seja, com 180°. Contudo, especificamente no complexo (5) observa-se a presença de átomos de hidrogênio ligados aos átomos N1, N3 e O2, indicando a conformação catiônica para este ligante produzindo assim um ânion complexo, sendo contrabalanceado pela presença do íon brometo.

As distâncias entre Cu–Cl e Cu–Br são aproximadamente 2,28 e 2,35 Å, respectivamente, o que é típico para este tipo de ligação. Observa-se essa distorção também em relatos de complexos de cobre(II) com geometria e ligantes similares.^{84,85}

O empacotamento de cristalino revelado por análise de difração de raios X de monocristal mostrou que todos os compostos de cobre são estabilizados por ligação de hidrogênio intra e intermolecular. Estas interações são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Ligações de hidrogênio dos complexos 1-5, com os respectivos comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação. Os desvios encontram-se entre parênteses.

Complexo	D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	(D-H...)
1	N(1)-H(1A)...O(3) ⁱ	0,86	1,87	2,699(7)	162,44
	O(3)-H(3B)...O(2)	1,06	1,75	2,784(6)	160,7
	O(2)-H(2)...Cl(1) ⁱⁱ	0,82	2,43	3,215(4)	159,5
2	N(1)-H(1)...O(3) ⁱⁱⁱ	0,82(6)	1,90(6)	2,709(7)	167,0(6)
	O(3)-H(3A)...O(2) ^{iv}	0,99	1,87	2,813(7)	157,6
	O(2)-H(2)...Br(1) ^v	0,67(5)	2,66(5)	3,303(5)	161,0(6)
3	N(1)-H(1)...O(3) ^{vi}	0,75(3)	1,95(3)	2,695(5)	173,0
	N(4)-H(4)...Cl(1) ^{vii}	0,81(4)	2,85(4)	3,646(4)	170,0
	O(2)-H(2)...O(1) ^{viii}	0,82	2,31	2,930(5)	132,4
	O(2)-H(2)...Cl(1) ^{viii}	0,82	2,56	3,281(3)	146,9
4	N(4)-H(4)...O(4) ^{ix}	0,86	2,24	3,097(11)	173,7
	N(1)-H(1A)...O(3)	0,86	1,82	2,682(10)	177,1
	O(2)-H(2)...O(1) ⁱ	0,82	1,99	2,772(8)	159,9
	O(4)-H(4A)...Br(1) ^x	1,08	2,53	3,602(8)	171,0
5	N(1)-H(1)...Br(2) ^{xi}	0,86	2,36	3,216(6)	177,2
	N(4)-H(4A)...O(3)	0,86	2,56	3,231(9)	135,8
	N(4)-H(4A)...Br(1) ^{xii}	0,86	2,64	3,363(7)	142,1
	N(4)-H(4B)...Br(1) ^{xiii}	0,86	2,65	3,480(7)	163,1
	N(3)-H(3A)...O(3)	0,86	1,88	2,717(8)	164,5
	O(3)-H(3B)...O(2) ^{xiv}	0,79	2,11	2,892(9)	168,4
	O(3)-H(3C)...O(1) ^{xii}	0,93	2,28	3,200(8)	168,8

O(2)-H(2)···Br(2)	0,82	2,38	3,199(6)	176,8
-------------------	------	------	----------	-------

Simetria: (i) $-x+3/2, y-1/2, -z+1/2$; (ii) $-x+2, -y, -z+1$; (iii) $x-1/2, -y+3/2, z+1/2$; (iv) $-x+1, -y+1, -z+1$; (v) $-x, -y+2, -z+1$; (vi) $x, y+1, z+1$; (vii) $-x+1/2, y-1/2, -z+3/2$; (viii) $-x+1/2, -y+5/2, -z+2$; (ix) $x, y+1, z-1$; (x) $-x+3/2, -y+3/2, -z+1$; (xi) $x, y, z-1$; (xii) $x, y, z+1$; (xiii) $x-1/2, -y+1/2, z+1/2$; (xiv) $x-1, y, z$.

Nos complexos (1) e (2) pode-se destacar as ligações hidrogênio intermolecular entre o átomo de oxigênio da molécula de água com o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel da piridina e ao átomo de hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio do grupo fenol. As ligações hidrogênio intermolecular entre o átomo de hidrogênio O2-H(2a) e os íons Cl⁻ e Br⁻ nos complexos (1) e (2) respectivamente, formam um arranjo supramolecular de moléculas em paralelo com um desenvolvimento semelhante a dímeros. Pode-se destacar o desenvolvimento de um arranjo supramolecular tridimensional através das ligações hidrogênio intermoleculares entre o átomo de hidrogênio N1-H(1a) e o átomo de oxigênio O3. A Figura 24 está representado o arranjo supramolecular do complexo [Cu(HL¹)Cl]·H₂O.

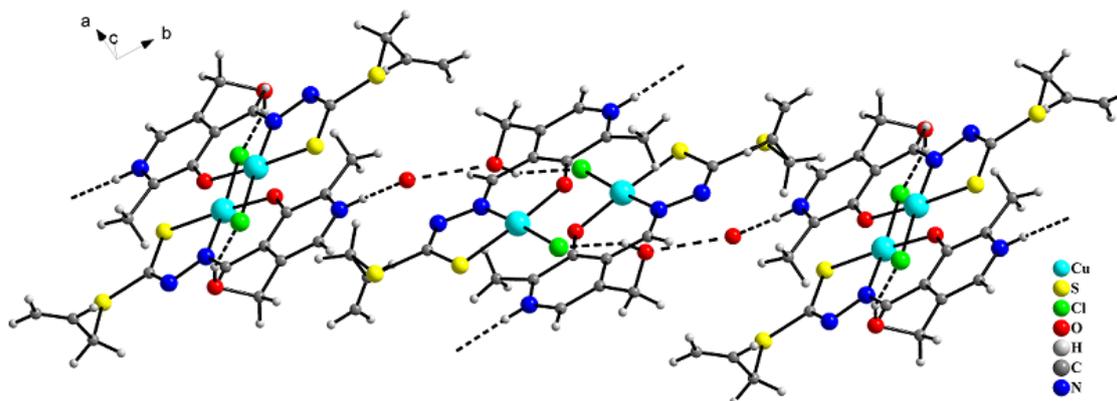


Figura 24. Representação das ligações hidrogênio do complexo (1). As linhas pontilhadas indicam as ligações hidrogênio intermoleculares existentes na estrutura.

Entretanto no complexo (5), forma-se uma rede tridimensional ligando o cátion complexo, o íon brometo e a molécula de água. Curiosamente, a ligação de hidrogênio intra e intermolecular conectou o Br2 com dois cátions complexos, onde Br(2)···O(2) com distância de 3,199(6)Å e Br2···N(1)ⁱ de 3,216(6)Å (i: 2 - x, 1 - y, 2 - z). Essas interações são importantes para a cristalização do composto e na formação de uma estrutura supramolecular, apresentada na Figura 25.

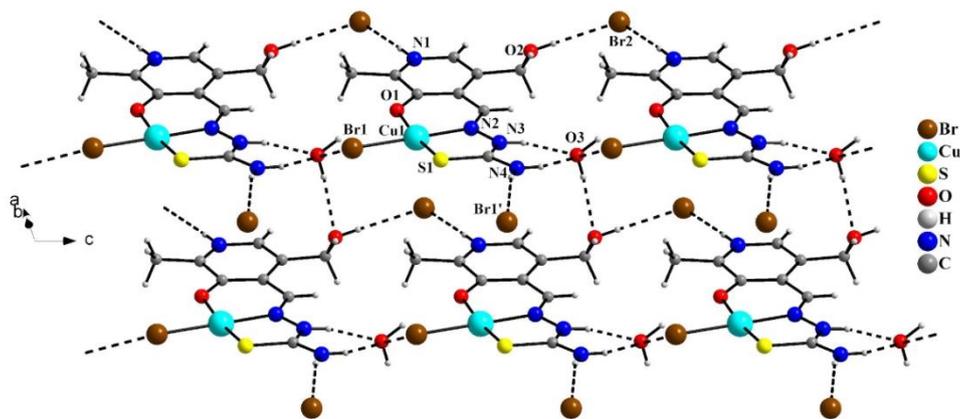


Figura 25. Representação das ligações hidrogênio do complexo (5). As linhas pontilhadas indicam as ligações hidrogênio intermoleculares existentes na estrutura.

A cela unitária dos complexos (1), (2) e (5) cristalizam no sistema cristalino monoclinico e grupo e espacial $P2_1/n$, apresentando 4 unidades assimétricas em seu interior. As Figura 26 e 27 representam respectivamente a cela unitária destes compostos ao longo do plano cristalográfico cb e a representação gráfica da cela de referência de número 14 da *International Tables for Crystallography*⁷⁷ indicando os operadores de simetria presentes na cela. Observa-se que as celas unitárias apresentam eixo helicoidal 2_1 , planos de reflexão, plano de deslizamento ao longo do eixo cristalográficos b , e centro de inversão como operadores de simetria.

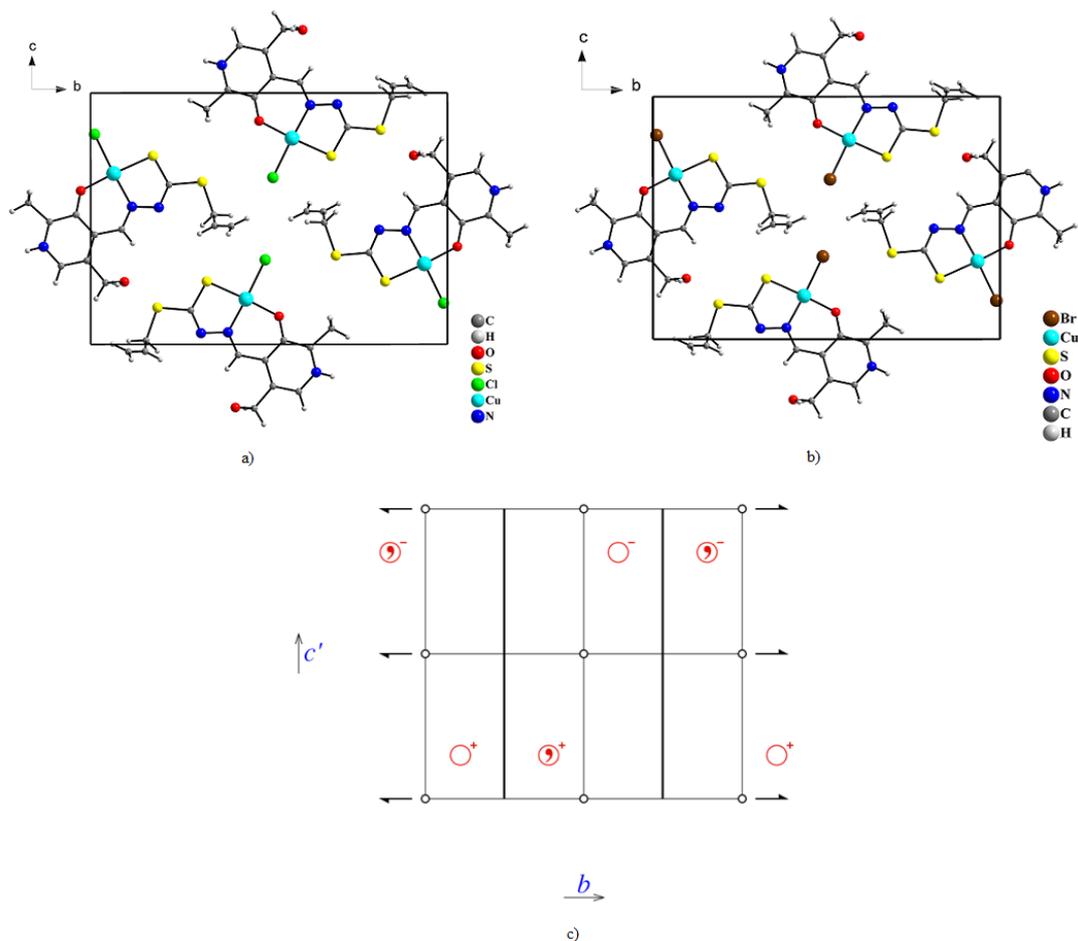


Figura 26. Cella unitária do composto (1) em (a) e do composto (2) em (b), segundo o plano cristalográfico cb . Em (c) o diagrama extraído da *International Tables for Crystallography*⁷¹ referente ao grupo espacial $P2_1/n$.

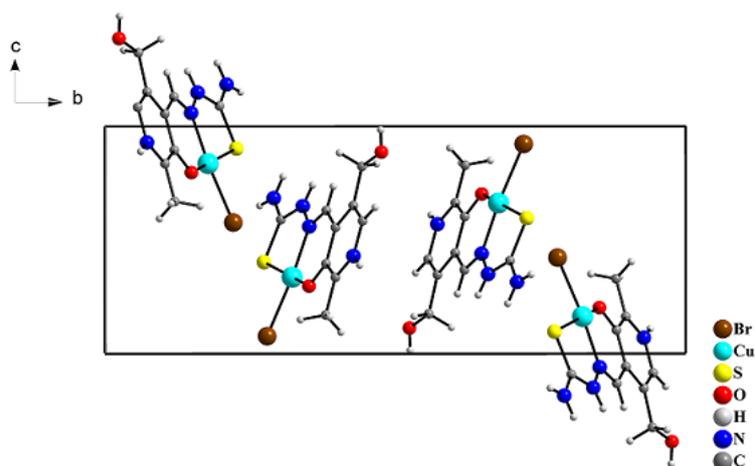


Figura 27. Cella unitária do complexo (5) em (a), vista através do plano cristalográfico bc .

A estrutura cristalina e molecular dos complexos (3) e (4) pertencem ao sistema cristalino monoclinico e grupo espacial $C2/c$, onde a cela unitária dos complexos e a

representação gráfica referente a cela de referência de número 15 extraída da *International Tables for Crystallography*⁷⁷ encontram-se representadas respectivamente nas Figuras 28. Observa-se que a cela unitária é composta pelos operadores de simetria centro de inversão, plano de deslizamento paralelo ao eixo cristalográfico ac com deslocamento na direção de c e eixo helicoidal 2_1 em direção ao eixo b .

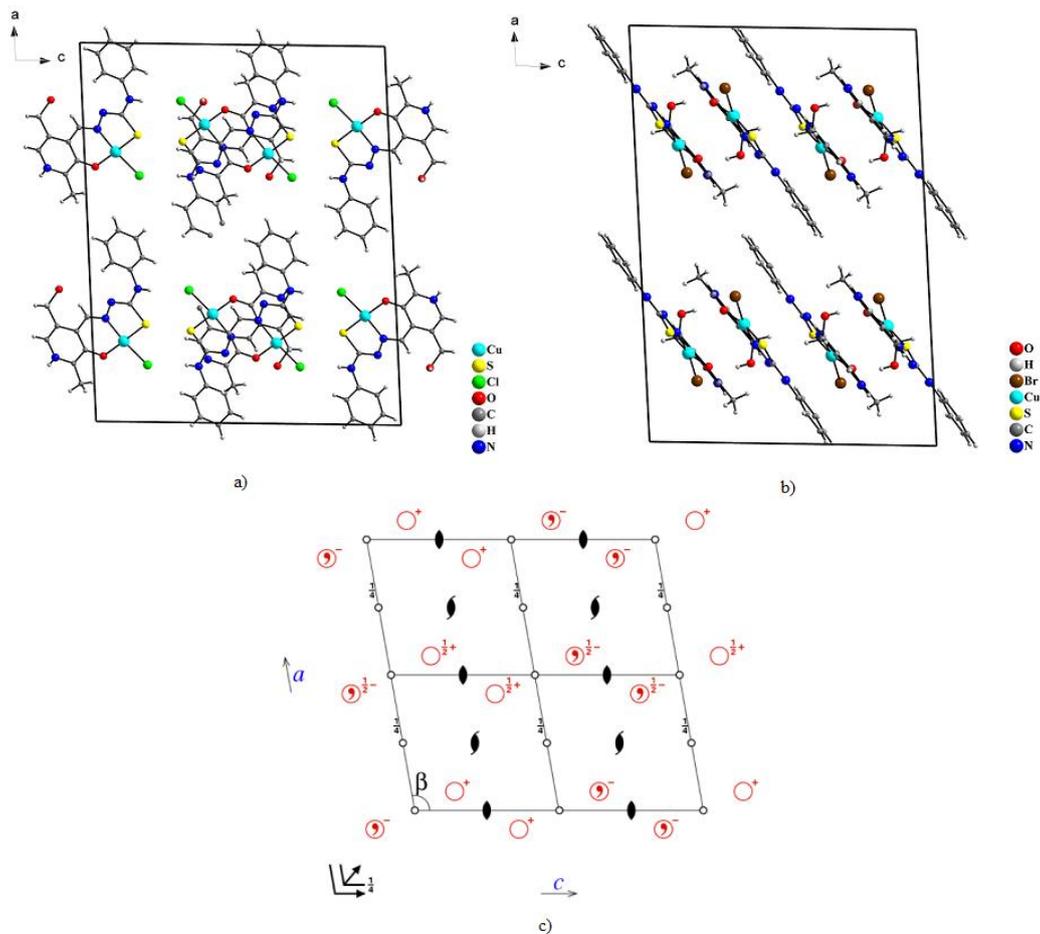


Figura 28. Cela unitária dos complexos (3) em (a) e (4) em (b) segundo o plano cristalográfico ac . Em (c) o diagrama extraído da *International Tables for Crystallography*⁷¹ referente ao grupo espacial $C2/c$.

4.5.2 Análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho para os compostos 1-5.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho médio ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) dos ligantes H_2L^1 , H_2L^2 e H_2L^3 , além dos complexos (1-5) foram analisados comparando-se as vibrações observadas no espectro do ligante na forma livre com as observadas nos espectros dos complexos e assim avaliar a coordenação do átomo de cobre(II) à molécula do ligante nos complexos obtidos.

Os valores em número de onda das bandas referentes aos principais modos normais de vibração presentes nos ligante e em seus respectivos complexos de cobre(II) encontram-se listados na Tabela 8. Os modos vibracionais envolvendo o átomo de cobre não foram listados, visto que geralmente são observados abaixo de 400 cm^{-1} , o que está fora da faixa espectral utilizada no equipamento para a obtenção dos espectros vibracionais.

Tabela 8. Frequências (cm^{-1}) de estiramento e deformação angular dos modos normais de vibração selecionados para os compostos H_2L^1 , H_2L^2 , H_2L^3 e (1-5).

Composto	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{N}-\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\nu(\text{S}-\text{C}-\text{S})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$
H_2L^1	1539	1260	863	1015	—
(1)	1719	1201	—	847	813
(2)	1767	1218	—	836	873
H_2L^2	1550	1204	845	—	—
(3)	1705	1207	—	—	850
(4)	1780	1232	—	—	839
H_2L^3	1571	1256	879	—	—
(5)	1671	1204	—	—	813

As bases de Schiff tridentadas (H_2L^1 , H_2L^2 e H_2L^3) podem sofrer tautomerização entre tiona-tiolato, entretanto os espectros de infravermelho (IV) dos proligantes exibem a presença de bandas características da forma tiona com bandas de $\nu(\text{C}=\text{S})$ na faixa de $879\text{-}845\text{ cm}^{-1}$. Nos espectros de IV dos complexos (1-5), observamos as bandas na região de $873\text{-}813\text{ cm}^{-1}$ que são características da $\nu(\text{C}-\text{S})$, indicando uma forma tiolato no estado sólido. Nos complexos metálicos, a $\nu(\text{C}=\text{N})$ é observado entre $1780\text{-}1705\text{ cm}^{-1}$ e $1569\text{-}1573\text{ cm}^{-1}$, porém nos ligantes livres as bandas observadas são em $1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ e $1571\text{-}1539\text{ cm}^{-1}$, evidenciando a coordenação de os átomos de nitrogênio azometínico com os átomos de cobre pois devido ao aumento destas bandas no complexo indicam a influência do metal sobre este grupo funcional, atingindo menores energias de vibração.⁸⁶ As bandas observadas em torno de $2890\text{-}2755\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas ao $\nu(\text{N}-\text{H}^+_{\text{py}})$, o nitrogênio protonado do anel de piridina.

Em todos os compostos, os espectros de IV exibem o $\nu(\text{N}-\text{N})$ na faixa de $1260\text{-}1201\text{ cm}^{-1}$, em que ocorreram os deslocamentos de bandas características dos ligantes em relação aos seus complexos. A frequência de estiramento de $\nu(\text{CSS})$ no ligantes livre (em

torno de $1015\text{-}937\text{ cm}^{-1}$) diminuiu nos complexos (em $847\text{-}836\text{ cm}^{-1}$), indicando a complexação através do átomo de enxofre tiolato.⁸⁷

4.5.3 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e do visível.

Os espectros de absorção molecular na região do ultravioleta-visível, ou espectros eletrônicos, dos complexos (1) a (5), foram determinados utilizando concentrações de $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ nos solventes metanol e N,N-dimetilformamida (dmf). O objetivo de estudar os espectros eletrônicos foi de analisar possíveis transições eletrônicas presentes nos compostos sintetizados e verificar o efeito do solvente sobre as bandas de absorção. Na Figura 29 encontram-se representados os espectros de absorção obtidos no ultravioleta-visível dos complexos (1) a (5), na faixa de 200 a 600 nm.

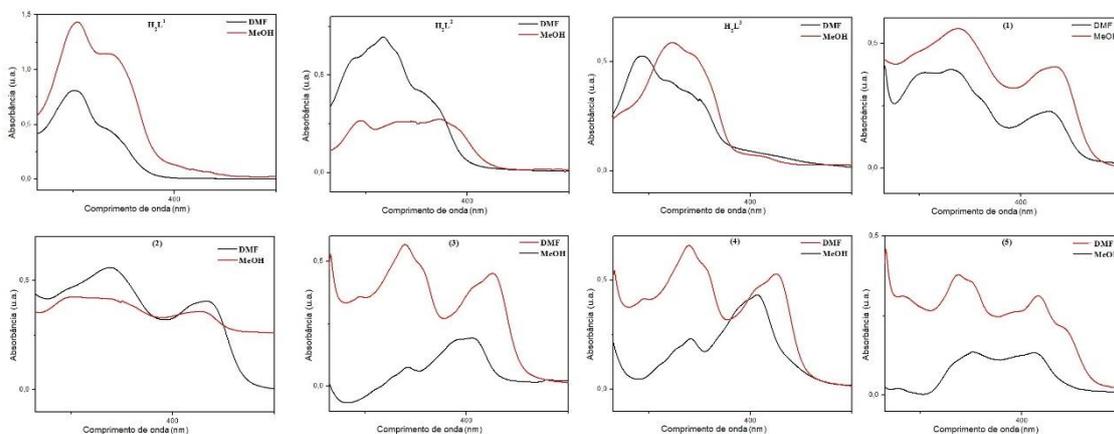


Figura 29. Espectros eletrônicos dos complexos (1) a (5) nos solventes MeOH e dmf (concentração de $1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$).

Os resultados obtidos na análise de espectroscopia eletrônica encontram-se listados na Tabela 9.

Tabela 9. Análise de espectroscopia eletrônica dos ligantes H_2L^1 , H_2L^2 , H_2L^3 e os complexos (1-5). Bandas de transição eletrônicas em nm, por espectroscopia UV-VIS.

Composto	Solvente	$\pi \rightarrow \pi^*$	$\log \epsilon^b$	$n \rightarrow \pi^*$	$\log \epsilon^b$	LMCT	$\log \epsilon$
H_2L^1	DMF	290	4.77	317	4.84	-	-
	MeOH	295	4.43	330	4.42	-	-
H_2L^2	DMF	301	4.91	332	4.66	-	-
	MeOH	234	5.30	304	5.16	-	-
H_2L^3	DMF	293	4.73	324	4.60	-	-
	MeOH	239	5.41	310	5.37	-	-
(1)	DMF ^a	-	-	332	4.49	422	4.35
	MeOH	224	4.98	338	4.74	434	4.61

(2)	DMF ^a	-	-	329	4.77	427	4.47
	MeOH	228	4.37	314	4.12	423	3.73
(3)	DMF ^a	-	-	339	4.75	426	4.65
	MeOH	262	4.89	336	4.56	429	4.94
(4)	DMF ^a	-	-	340	4.81	426	4.72
	MeOH	260	4.78	367	4.44	430	4.82
(5)	DMF ^a	-	-	332	4.56	412	4.48
	MeOH	241	4.16	337	4.15	416	3.94

(a) Valores de comprimento de onda e $\log \epsilon$ dos complexos não foram avaliados devido à faixa de absorção do solvente. (b) Valores de absorvidade molar (ϵ) em $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Nos espectros analisados pode-se destacar que os ligantes, possuem bandas de absorção na faixa de 234–332 nm com valores de $\log \epsilon$ entre 5,16 e 4,66, sendo que essas bandas correspondem às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$. Nos espectros dos complexos, as bandas de absorção são deslocadas para menores bandas de absorção, indicando coordenação dos ligantes ao átomo de cobre(II). Observa-se também o surgimento de bandas do tipo TCLM (transição de carga ligante-metal) nos espectros dos complexos na região de 412–434 nm, o que também indica a formação dos compostos de coordenação. A transição TCLM $S \rightarrow \text{Cu(II)}$ foi atribuída em bandas próximas de 420 nm nos complexos de cobre (II), com valores similares relatados na literatura⁸⁷.

Transições do tipo d-d ocorrem na região do visível, explicando as colorações observadas nos complexos de cobre (II) com ligantes ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas sintetizados. Essas transições são proibidas por Laporte, pois envolvem transições entre estados com mesma simetria², ocasionando baixos valores de absorvidade molar para as absorções nos espectros que envolvam transições d-d. Devido à baixa concentração em que foram obtidos os espectros apresentados anteriormente, não foi possível observar bandas de absorção referentes às transições d-d e, por esta razão, foi realizado a análise dos espectros eletrônicos dos complexos utilizando soluções de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. A Tabela 10 e a Figura 30 apresentam respectivamente os valores de comprimento de onda e de $\log \epsilon$ obtidos para as transições d-d observados nos espectros dos complexos.

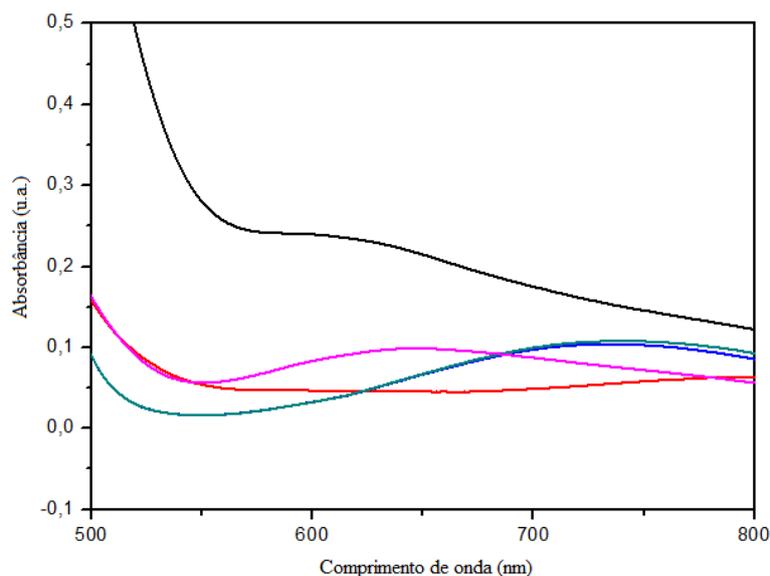


Figura 30. Espectros eletrônico dos complexos (1) em preto, (2) em vermelho, (3) em azul, (4) em roxo e (5) em rosa, com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ preparadas em metanol.

As bandas de absorção referentes à transição d-d nos complexos são observadas na faixa entre 625 e 750 nm e com baixos valores de $\log \epsilon$ variando entre 1,76 e 7,76, resultados condizentes com o esperado para complexos semelhantes.⁷⁶

Tabela 10. Análise de espectroscopia eletrônica dos complexos de cobre (II) na região do visível com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$. Bandas de transição eletrônica em nm.

	λ transição d-d (nm)	$\log \epsilon$ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
(1)	625	2,36
(2)	750	1,76
(3)	735	2,01
(4)	723	2,03
(5)	648	1,99

4.6 Análises Biológicas.

4.6.1 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

Os complexos de Cu(II) (1-5) e os ligantes ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas derivados do piridoxal foram testados nas concentrações 0,2 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ quanto a seus potenciais antitumorais através da avaliação de suas capacidades de inibirem a viabilidade de células tumorais. Foram avaliadas as linhagens celulares de tumores murino Sarcoma-180 e Ehrlich.

A avaliação de atividade citotóxica *in vitro* dos complexos utilizando ensaios de MTT, indicaram que o complexo (5) inibiu o crescimento tumoral das linhagens celulares Sarcoma-180 e Ehrlich de maneira dependente. O complexo 5 apresentou citotoxicidade significativa em comparação com a doxorrubicina, com um valor de IC₅₀ de 33,30 (\pm 0,06) μ M contra um valor IC₅₀ de 89,18 (\pm 2,30) μ M em células S-180. O mesmo pode ser observado na linhagem celular de Ehrlich, com um valor de IC₅₀ de 16,89 (\pm 1,02) μ M, comparando com um valor de IC₅₀ de 143,80 (\pm 12,70) para a doxorrubicina, todos em um experimento simultâneo.

A atividade citotóxica da doxorrubicina, medicamento de referência), os ligantes livres e os complexos de cobre(II) (1–5), assim como a concentração de inibição que causa uma diminuição de 50% no crescimento celular (IC₅₀), estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Atividade citotóxica (IC₅₀)^a, dos ligantes livres H₂L¹, H₂L² e H₂L³, dos complexos (1-5) e da doxorrubicina, tratados durante 48 horas com concentrações entre 0,2 a 200 μ mol.L⁻¹ nas linhagens celulares S-180 e Ehrlich.

Compostos	S-180	EHRlich
H ₂ L ¹	25,3 (\pm 3,52)	*
H ₂ L ²	*	*
H ₂ L ³	*	*
(1)	37,49 (\pm 2,30)	55,90 (\pm 2,20)
(2)	25,20 (\pm 1,46)	*
(3)	53,40 (\pm 1,80)	*
(4)	36,69 (\pm 0,73)	89,85 (\pm 1,44)
(5)	33,30 (\pm 0,06)	16,89 (\pm 1,02)
Doxorubicina	89,18 (\pm 2,30)	143,8 (\pm 12,70)

^aAtividade citotóxica expressa como valor médio \pm erro padrão da média (μ mol.L⁻¹) de pelo menos três experimentos independentes com interval de confiança a 95%. * IC₅₀ não determinado devido a inibição ser inferior a 50%.

A Figura 31 mostra os gráficos de viabilidade celular para as linhas celulares Sarcoma-180 e Ehrlich dos compostos 1-5.

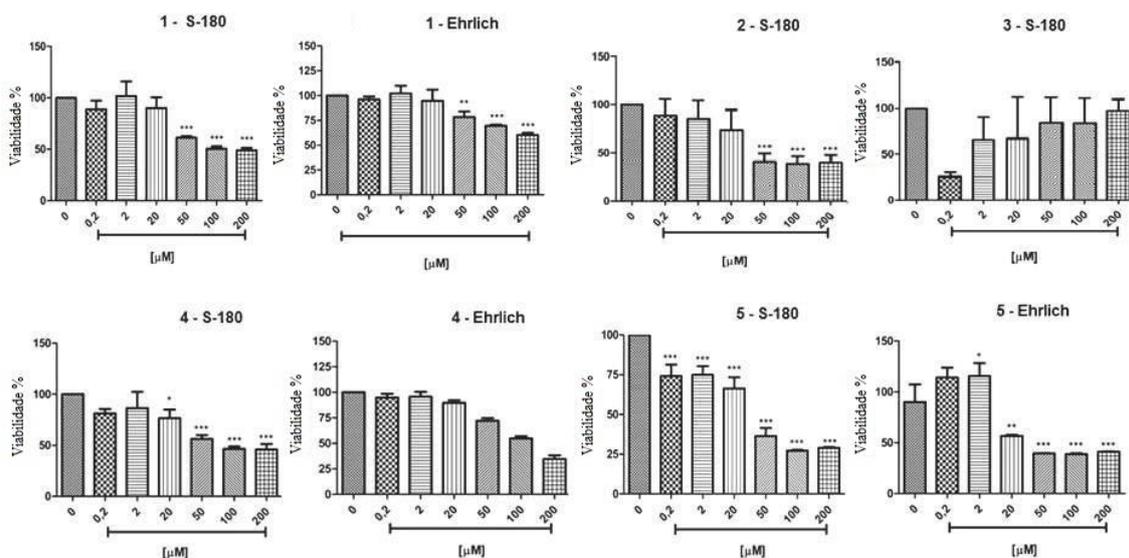


Figura 31. Efeito dos complexos (1-5) sobre a viabilidade de células murinas S-180 e Ehrlich tratadas com diferentes concentrações (0,2-200 μM) e após 48 h de tratamento a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT. Os asteriscos (*) representam uma diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa quando comparados com células não estimuladas pelo teste de análise de variância ANOVA one-way. Os valores de significância estatística são indicados por asteriscos, representando valores de p (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Os complexos (1) e (4) apresentaram valores mais elevados de IC_{50} contra as linhagens tumorais, conseqüentemente observa-se uma atividade antitumoral menor do que o complexo (5). Portanto pode-se indicar que concentrações menores deste composto são necessárias para inibir o crescimento de células cancerígenas, contudo melhores resultados comparados a doxorrubicina, onde medicamento avaliado nas mesmas condições e apresenta-se concentrações maiores para atingir a mesma inibição. Não foi possível determinar o IC_{50} para a linha celular de Ehrlich dos complexos (2) e (3). Portanto, devido o melhor desempenho em ensaios prévios, o complexo 5 foi selecionado para os seguintes ensaios.

Na Tabela 11, observa-se que o único valor de IC_{50} determinado para os ligantes foi o ditiocarbazato H_2L^1 em células S-180, entretanto os complexos deste ligante não aumentaram a eficácia contra esta linha celular, salvo o complexo (1) que exibe citotoxicidade moderada em células de Ehrlich.

Devido algumas tendências para esta classe de compostos, é evidenciado que a atividade citotóxica dos complexos apresentados é atribuída às propriedades bioquímica dos ligantes, no entanto, observa-se que os complexos (2-5) apresentam citotoxicidade e que não são detectados ligantes livres. Essa característica não é uma exceção e está relacionada a alguns fatores presentes nos complexos formados. Nos estudos publicados por Dobrova⁸⁸ e em nosso grupo de pesquisa⁸⁹, os experimentos de citotoxicidade em células

tumorais, observou-se que o composto de cobre(II) tem citotoxicidade até 8 vezes maior do que o ligante livre. Também, em estudos apresentados por Low⁹⁰, indicam que o ligante livre é inativo contra a linhagem de células tumorais, mas o complexo de cobre a citotoxicidade aumenta significativamente.

Com o aprofundamento neste tipo de pesquisa, pode-se afirmar que a eficiência dos complexos metálicos em relação aos ligantes livres deve-se à melhor interação com as células. Em geral, é possível atribuir aos complexos formados uma mudança significativa em várias propriedades físico-químicas, tais como peso molecular, geometria espacial e propriedades redox, em particular, os complexos de cobre(II).⁹¹

4.6.2 Confirmação da indução de apoptose por dupla coloração com Hoechst 33342 e iodeto de propídio

O kit de detecção de apoptose por coloração dupla (Hoechst 33342 / PI) fornece um ensaio rápido e conveniente para avaliar a apoptose, com base na detecção de fluorescência para o estado compactado da cromatina em células apoptóticas. Estes dois corantes atuam interagindo com o DNA das células. O corante Hoechst 33342, possui fluorescência azul com emissão máxima entre 350-461 nm, quando ligado ao DNA), corando a cromatina condensada em células apoptóticas de uma forma mais intensa do que a cromatina em células normais. O iodeto de propídio (PI), é um corante de fluorescência vermelha com emissão máxima entre 535-617 nm, quando ligado ao DNA, porém é permeante apenas às células mortas. O padrão de coloração resultante do uso simultâneo desses corantes torna possível distinguir e quantificar populações de células normais, apoptóticas e mortas por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência.

Este teste permitiu observar que as células apoptóticas fossem distinguidas das células necróticas por alterações morfológicas em células Sarcoma-180 e Ehrlich tratadas com complexo (5), apresentados na figura 32.

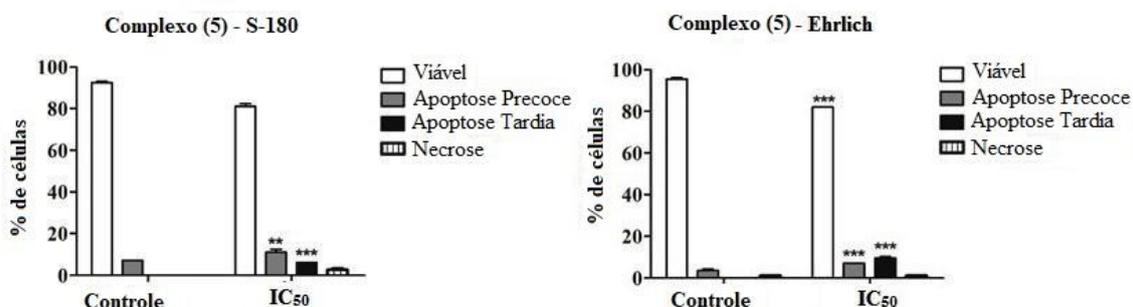


Figura 32. Porcentagem de células S-180 e Ehrlich em apoptose e necrose de camundongos após tratamento com o complexo 5, por dupla coloração com HO / PI. Os dados mostram a média \pm DP de quatro

animais por tratamento. A diferença de significância estatística com o controle, sem tratamento, são indicadas por asteriscos representando valores de p (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Verificou-se que células com cromatina fragmentada e azulada com brilho intenso e que estão em fase de apoptose recente, são mais abundantes em comparação com células com cromatina altamente condensada e fragmentada rosa ou vermelha, que estão em apoptose tardia, que representam a baixa taxa de necrose das células.⁹¹

De acordo com os valores observados, pode-se afirmar que nos achados morfológicos, o composto (5) induz a apoptose no Carcinoma de mama de Murino Ehrlich e no Tumor de Sarcoma S-180. Nas células do Sarcoma-180, o complexo induz uma porcentagem maior de apoptose precoce do que a apoptose tardia, e o oposto pode ser observado na linhagem celular de Ehrlich, representados na Figura 33.

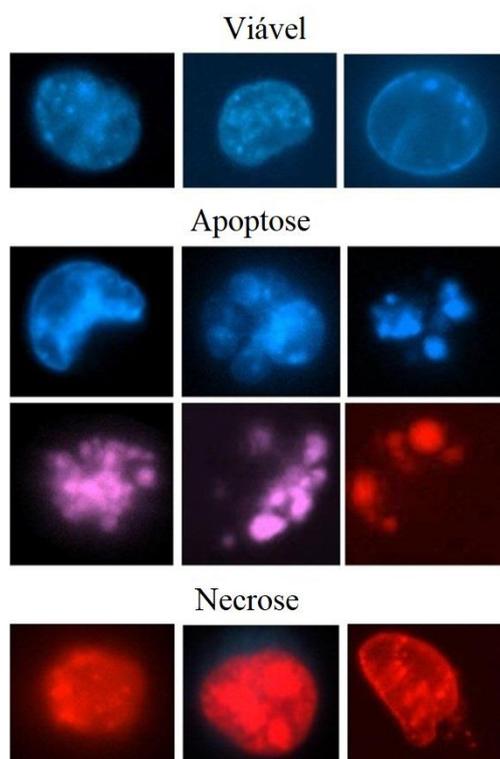


Figura 33. Alterações morfológicas das células S-180 e Ehrlich detectadas por coloração dupla de Hoechst 33342 / PI após o tratamentos com o complexo 5, onde as alterações são indicadas pelas seguintes informações: a viabilidade é indicada pela cromatina azul com estrutura organizada, na necrose observa-se a cromatina vermelha com estrutura organizada, a apoptose precoce (cromatina azul brilhante altamente condensada ou fragmentada) e apoptose tardia (cromatina rosa ou vermelha altamente condensada ou fragmentada).

Também é identificado que o baixo nível de necrose do composto pode estar relacionado à via de morte causada pelo do composto, portanto a via principal seria apoptótica ($p > 0,001$). Estudos mostram que compostos com características semelhantes também podem induzir essa via, como nos resultados reportados por Liu⁹², em que quatro complexos induziram a apoptose de células cancerígenas, principalmente na fase inicial.

4.6.3 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-qPCR)

A PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR) é usada quando o material de partida é o RNA. Neste método, o RNA é primeiramente transcrito em DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa do RNA total ou RNA mensageiro (mRNA). O cDNA é então usado como modelo para a reação qPCR. Sendo assim, o método RT-qPCR é usado em uma variedade de aplicações, incluindo análise de expressão gênica. Portanto, por fluorescência é possível marcar e quantificar os genes específicos que direcionam o processo de apoptose.

A Figura 34 mostra as expressões dos transcritos *Caspase3*, *Caspase8*, *Caspase9*, *Bax* e *TP53* analisadas por RT-qPCR em células Sarcoma-180 e Ehrlich tratadas com a concentração de 10 μ M do complexo (5) por um período de 3 h.

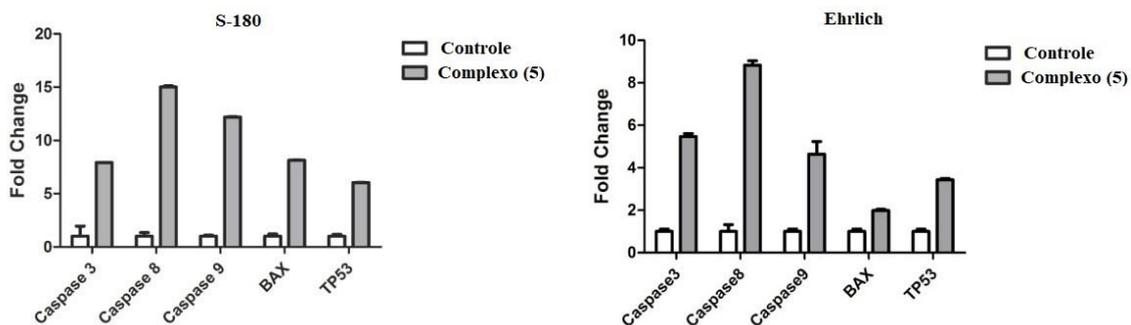


Figura 34. Efeitos do tratamento com o complexo (5) na expressão de mRNA em células S-180 e Ehrlich.

É evidente que todos os genes analisados mostraram um nível muito alto de expressão em ambas as linhagens tratadas com complexo (5) em comparação com controle analisado (sem tratamento). A expressão desses genes induziu eventos relacionados à apoptose, porque a super expressão está diretamente envolvida no processo de morte celular. Embora a linhagem Sarcoma-180 tenha apresentado um nível mais alto de expressão gênica, com exceção dos genes *Bax* e *TP53*, a expressão gênica para ambas as linhagens mostrou o mesmo parâmetro. No Sarcoma-180, a expressão do gene *TP53* foi aumentada em comparação com a linhagem de Ehrlich e o oposto ocorreu com o *Bax*, uma expressão importante no Sarcoma-180 do que na linhagem celular Ehrlich. A via intrínseca ou extrínseca pode iniciar Apoptose⁹³, entretanto a via extrínseca pode cruzar a via intrínseca através da clivagem mediada por *caspase8* do BID. Os dados podem ser compreendidos pela expressão do aumento do gene *Caspase8* em 3 h, com expressão mínima

de 12,90 e 6,30 vezes, comparativamente para as linhas de células Sarcoma-180 e Ehrlich não tratadas, respectivamente.

Em vários estudos com complexos de cobre (II), foi demonstrado que a formação de adutos interagindo com o DNA em proporção à dosagem administrada está amplamente envolvida no mecanismo de ação da citotoxicidade desta classe de compostos metálicos.⁹⁴ Os níveis mais altos de todas as Caspases indicam que a apoptose realmente ocorre junto com os outros resultados.

O aumento dos níveis de *TP53* promovido por *Bax* tem sido amplamente documentado como o tipo de via mitocondrial (intrínseca) de indução de apoptose⁹⁵ e a presença da *Caspase 3* clivada e ativada apresentada na Figura 35 comprovam as observações do presente estudo.

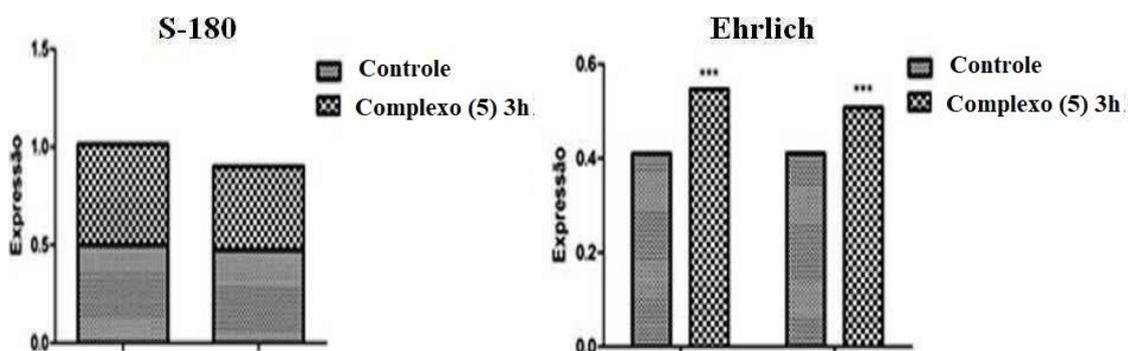


Figura 35. Atividades proteolíticas na caspase 3 após o tratamento com o complexo (5) nas células S-180 e Ehrlich.

A ativação da *Caspase 3* é um evento precoce e inicia um dano apoptótico causando extensa, encolhimento e fragmentação do DNA condensado, e sua proteína interage tanto com *Caspase8* quanto com *Caspase9*.⁹⁶ Esta ativação pode ser observada nas células S-180, que apresentaram maior quantidade de apoptose precoce, porém nas células de Ehrlich a quantidade de células na apoptose tardia foi maior. Os resultados apresentados nos levam a afirmar que o mecanismo de morte da célula desencadeada pelo complexo (5) nas linhagens S-180 e Ehrlich indicam provavelmente uma apoptose intrínseca, entretanto não pode-se excluir a participação de outros mecanismos de morte celular, ou da via extrínseca.

4.7 Complexos derivados da vitamina K₃

A partir da reação de condensação equimolar entre a menadiona e a semicarbazida ou isoniazida, obtêm-se os ligantes menadiona semicarbazona (K₃SZ) e menadiona isoniazida (K₃IZ). De acordo com as suas características quelantes, os compostos foram

sintetizados com o objetivo de serem utilizados como precursores na obtenção de novos complexos metálicos para a otimização de possíveis aplicações biológicas.

Os resultados de rendimento, ponto de fusão e análise elementar, analisados para os compostos derivados da vitamina K₃ foram: Para o composto K₃sz (229,24 g/mol) = Rendimento: 210,32 mg (91%). Ponto de Fusão: 212°C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 62,33 (63,12); H 5,67 (4,89); N, 18,17 (17,40). Para o composto K₃iz (291,10 g/mol) = Rendimento: 268,36 mg (92%). Ponto de Fusão: 231 °C. Análise Elementar % teórica (% experimental): C, 69,61 (69,12); H, 5,15 (4,99); N, 14,33 (13,97).

4.7.1 Análise estrutural dos compostos K₃sz e K₃iz

A análise de difração de raios X indica que os compostos K₃sz e K₃iz cristalizam no sistema cristalino triclínico e grupo espacial $P\bar{1}$, referência número 2 da *International Tables for Crystallography*⁷¹ e simetria de Laue $\bar{1}$. As Figura 36 e 37 representam a projeção ORTEP dos compostos com a numeração dos átomos constituintes da estrutura, exceto os átomos de hidrogênio.

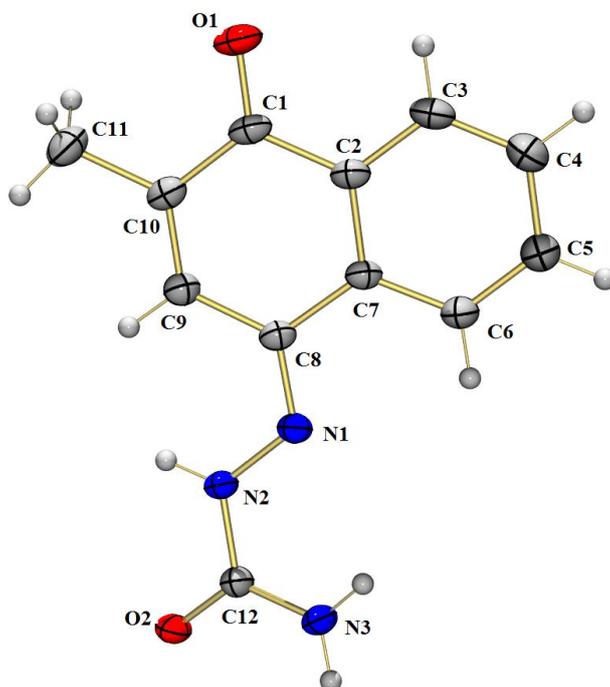


Figura 36. Projeção ORTEP do composto K₃sz. Elipsóides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.

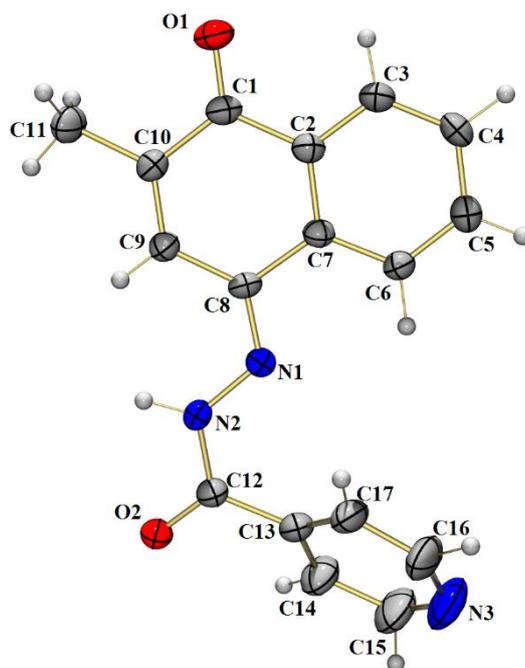


Figura 37. Projeção ORTEP do composto K3iz. Elipsoides térmicas representadas a um nível de probabilidade 30%.

No estado sólido, o composto K₃sz apresenta-se na forma de seu tautômero cetônico, evidenciado pelo valor de comprimento de ligação da carbonila C12–O2 de 1,216(3) Å, que possui valor coerente com o valor de 1,22 Å esperado para ligações duplas entre carbono e oxigênio, e pelo caráter de ligação simples observado na ligação C12–N2 com comprimento de ligação de 1,384(2) Å. Os comprimentos das ligações e ângulos de ligação estão de acordo com o observado na literatura para ligantes semelhantes desta classe de compostos.⁹ A Tabela 12 apresenta alguns valores de ângulos e comprimentos de ligação selecionados para os compostos K₃sz e K₃iz.

Tabela 12. Comprimentos e ângulos de ligação selecionados dos compostos K₃sz e K₃iz. Os desvios encontram-se entre parênteses.

Composto K ₃ sz					
Comprimentos de ligação (Å)				Ângulos de ligação (°)	
C1–O1	1,234(2)	C12–N2	1,384(2)	C12–N1–N2	121,1(5)
C12–O2	1,216(3)	C8–N1	1,301(2)	N1–N2–C8	119,0(4)
N1–N2	1,351(2)	N2–H2a	0,89	N3–C12–O2	120,1(5)
Composto K ₃ iz					
Comprimentos de ligação (Å)				Ângulos de ligação (°)	
C1–O1	1,224(6)	C12–N2	1,359(5)	C12–N1–N2	118,4(17)

C12–O2	1,223(5)	C8–N1	1,296(5)	N1–N2–C8	119,71(17)
N1–N2	1,362(5)	N2–H2a	0,86	N3–C12–O2	127,17(19)

O composto K_{3iz} também se apresenta na forma de seu tautômero cetônico, evidenciado pelo valor de comprimento de ligação da carbonila C12–O2 de 1,223(5) Å, coerente com o esperado para ligações duplas entre carbono e oxigênio e pelo caráter de ligação simples observada na ligação C12–N2 de 1,359(2) Å. Os comprimentos das ligações e ângulos de ligação estão de acordo com os observados na literatura e muito semelhantes ao composto K_{3sz} .

Os compostos K_{3sz} e K_{3iz} cristalizam no sistema cristalino triclinico e grupo espacial $P\bar{1}$, apresentando em ambos, duas unidades assimétricas em sua cela unitária. Na Figura 38 estão representadas as celas unitárias dos compostos K_{3sz} e K_{3iz} , segundo o longo do eixo cristalográfico c , e o diagrama referente ao grupo espacial $P\bar{1}$ extraído da *International Tables for Crystallography*⁷⁷ com a representação dos operadores de simetria presentes na cela. É possível observar que o único operador de simetria presente na cela unitária deste complexo é o centro de inversão.

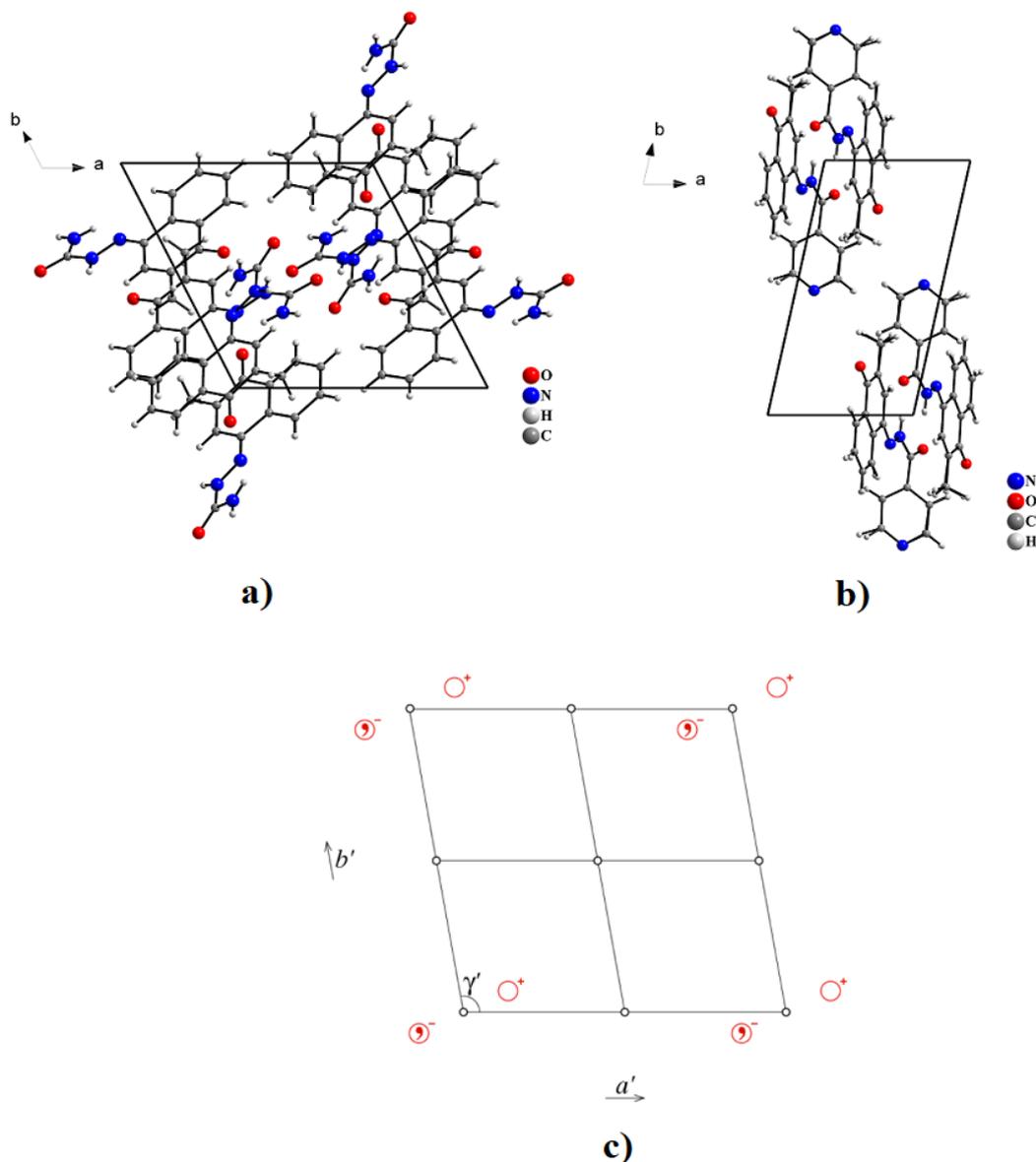


Figura 38. Projeção da célula unitária dos compostos (a) K3sz e (b) K3iz, vista através do plano cristalográfico ab . Em (c) o diagrama extraído da International Tables for Crystallography⁷⁷ referente ao grupo espacial $P\bar{1}$.

4.7.2 Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Com os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos K3sz e K3iz em solução de $\text{d}_6\text{-DMSO}$, foi possível observar todos os hidrogênios e carbonos presentes na estrutura. Para atribuir os sinais encontrados, na Figura 41, estão apresentadas as estruturas e seus respectivos sinais atribuídos aos deslocamentos químicos avaliados. Os espectros estão apresentados no apêndice.

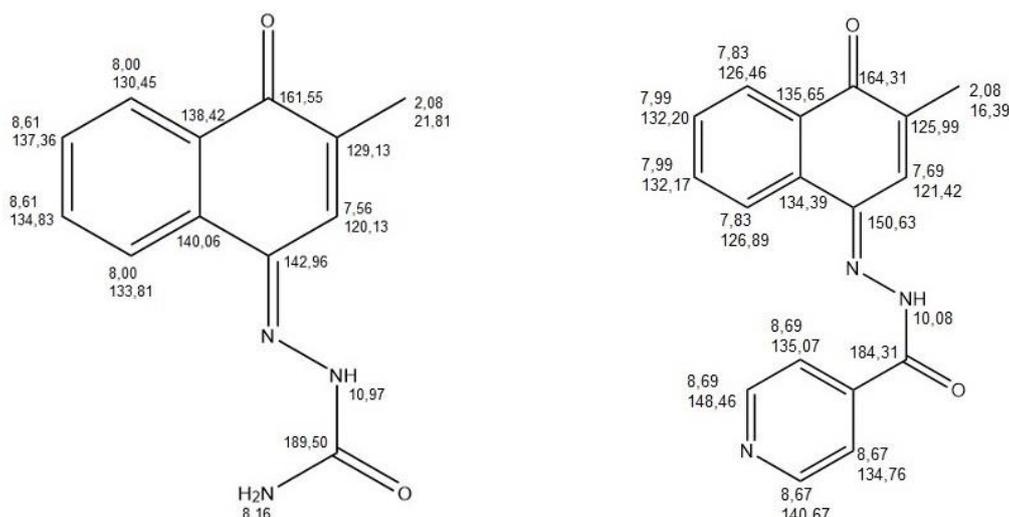


Figura 39. Representação estrutural dos compostos K_{3sz} e K_{3iz} e os valores de deslocamento químico de 1H e ^{13}C .

Os valores de deslocamento químico para atribuídos aos átomos de 1H , estão semelhantes aos encontrados na literatura.⁵⁴ Pode-se indicar os dubletos e multipletos relacionados ao deslocamento químico entre 7,00 e 9,00 ppm aos prótons presentes nos anéis aromáticos.⁹⁷ Destaca-se também os singletos com valores entre 10 e 11 ppm, indicando que tanto no estado sólido, quanto em solução, observa-se a presença do próton ligado ao átomo N2. No composto K_{3iz} , não é observado sinais relacionados a presença do próton no átomo de nitrogênio anel piridínico. Contudo no composto K_{3iz} , é observado um sinal com o deslocamento químico em 8,16 ppm, correspondente ao grupo amina desprotonado.

Aos núcleos de ^{13}C , pode-se destacar os valores entre 161 e 164 ppm indicando a presença do grupo carbonila nos dois compostos. Entretanto os valores elevados de deslocamento químico referente aos carbonos C=O no composto K_{3sz} é de 189,50 ppm e no composto K_{3iz} em 184,31 ppm, uma variação de 5,19 ppm. Esta variação ocorre devido ao grupo amina favorecer um ambiente mais desblindado.⁹⁸ Os valores de deslocamento químico observados no espectro entre 150 e 130 ppm são atribuídos aos núcleos de carbono presentes em anéis aromáticos sendo estes com deslocamentos mais elevados no anel nitrogenado.

4.8 Análises biológicas

Analisou-se o potencial antitumoral dos compostos K_{3sz} e K_{3iz} através da avaliação de suas capacidades em inibirem a viabilidade de células frente a linhagem de tumor sólido MCF-7. O tratamento *in vitro* foi realizado com doses entre 2 e 200 μM no período

de 24 horas de incubação, assim como, o teste realizado em células mononucleares do sangue (PBMC), para observar o comportamento seletivo para esse tipo de célula tumoral.

4.8.1 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A viabilidade celular das células MCF-7 e PBMC foram avaliadas com o teste de análise colorimétrica com o corante MTT, onde os valores de absorção máxima da solução em 570 nm e os devidos tratamentos estatísticos indicaram ou não a morte de 50% das células, o IC₅₀.

Foi avaliado apenas a medida de IC₅₀ ($62,15 \pm 2,80 \mu\text{M}$) para o composto K₃sz, em células tumorais. Entretanto frente ao composto K₃iz as células são viáveis em 24 horas de tratamento, como pode ser observado nos gráficos apresentados na Figura 42.

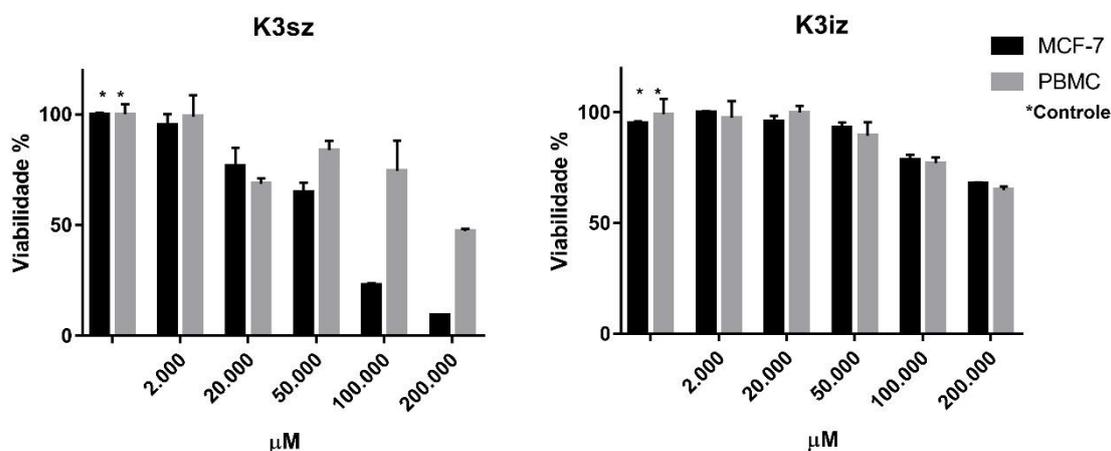


Figura 40. Efeito dos compostos K₃sz e K₃iz sobre a viabilidade de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações (2-200 μM) e após 24 h de tratamento a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT.

A viabilidade do composto K₃sz é observável em células tumorais devido a presença de uma semicarbazona simples em sua estrutura, pois o aumento da solubilidade em água favorece o caminho do composto bioativo no organismo.⁹⁹ Apesar de não apresentar citotoxicidade em células normais, pode-se considerar como um composto seletivo para células tumorais, devido a grande diferença entre as viabilidades comparadas.¹⁰⁰

O composto K₃iz não apresentou atividade citotóxica em ambas as células analisadas, devido a sua estrutura possivelmente não estar adequada para iniciar as vias de morte celular. Em alguns relatos, é observado que as cadeias mais longas de hidrocarbonetos podem ter contribuir para o aumento da permeabilidade celular¹⁰¹, entretanto no composto K₃iz apresenta em sua estrutura anéis heterocíclicos com grande localização de cargas. Este fato também pode estar relacionado com a união entre a menadiona e a isoniazida que diminui a reatividade com meio biológico, pois apesar de isoladamente a isoniazida

e seus análogos apresentarem citotoxicidade em diversas linhagens de células tumorais, neste composto sua atividade foi reduzida.¹⁰²

5. CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos e dos resultados obtidos durante a execução do presente trabalho sobre a síntese, caracterização e estudo biológico de complexos de cobre(II) com derivados das vitaminas B₆ e K₃, pôde-se concluir que:

I. Foram sintetizados e caracterizados 5 complexos inéditos de cobre(II) com ligantes ditiocarbazato e tiossemicarbazona derivados da vitamina B₆, além de dois ligantes semicarbazona e hidrazona, derivados da vitamina K₃;

II. Através da análise de difração de raios X de monocristal, foram elucidadas as estruturas cristalinas inéditas de sete novos compostos, sendo cinco de complexos de cobre(II) derivados de piridoxal ditiocarbazatos e piridoxal tiossemicarbazonas, além dois compostos, semicarbazona e hidrazona derivados da menadiona;

III. As estruturas rígidas apresentadas pelos ligantes utilizados ocasionaram distorções nos poliedros de coordenação nos complexos de cobre(II) sintetizados, que foram verificados pelos valores de ângulos e comprimentos de ligação obtidos nas análises por difração de raios X de monocristal;

IV. O método empregado na elucidação estrutural dos compostos obtidos mostrou bastante eficácia e boa resolução, visto que os índices de discordância encontrados na determinação das estruturas possuem valores menores do que 0,0772, o que são considerados valores bons para a determinação de estruturas cristalinas;

V. As análises de espectroscopia de ressonância magnética de ¹H e ¹³C detalharam os átomos de carbono e hidrogênio presentes nos ligantes sintetizados. As análises de infravermelho indicaram a presença de grupos funcionais característicos dos ligantes em que nos complexos metálicos apresentam variação dos modos vibracionais, devido a coordenação ao centro metálico. Ainda assim, os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-VIS indicaram a coordenação do ligante ao metal devido às transições características, mostrando-se estáveis em dois solventes. Portanto, as análises espectroscópicas corroboram com as estruturas elucidadas por difração de raios x.

VI. Os testes que avaliam a viabilidade celular, revelaram que o ligante H₂L¹ e os complexos de cobre(II) aumentaram a capacidade de inibir o crescimento das células tumorais S-180 e Ehrlich, exceto os complexos (2) e (3) que não apresentaram inibição para células tumorais de Ehrlich, sendo que de acordo com os testes realizados com o complexo (5), foi possível observar a via de morte das células em tratamento, confirmando a morte das células tumorais por apoptose;

VII. Dos compostos derivados da vitamina K₃, o composto K₃SZ apresentou efeito citotóxico no tratamento em células de adenocarcinoma mamário MCF-7.

O presente trabalho possibilitou observar as características estruturais de complexos de cobre(II) coerentes com a literatura, assim como, dos possíveis modos de coordenação de ligantes bases de Schiff, destacando-se os ditiocarbazatos, tiosemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas, sendo que o método de difração de raios X de monocristal foi uma análise essencial para a elucidação e determinação das estruturas apresentadas nesse trabalho.

Os compostos inéditos descritos neste trabalho, após caracterizá-los, foram analisados em diferentes linhagens de células sendo efetivos no tratamento *in vitro* de células tumorais. Mesmo os tumores S-180 e Ehrlich não estarem no topo da lista das neoplasias mais frequentes, os estudos fornecem um direcionamento de como submeter novos ensaios de forma otimizada e aprofundar os estudos sobre o mecanismo de ação desta classe de compostos. Contudo foi possível analisar e identificar o mecanismo de morte programada, induzido pela dosagem controlada do complexo de cobre(II) com o ligante tiosemicarbazona derivado do piridoxal. Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se evidenciar que os novos complexos de cobre(II) com ligantes bases de Schiff derivados das vitaminas B₆ e K₃, podem ser avaliados contra outras linhagens de células tumorais, inclusive as resistentes aos tratamentos atuais, sendo assim posteriormente avaliadas também em ensaios clínicos, para o uso no tratamento de câncer.

**6. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Bolster, M. Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry (IUPAC Recommendations 1997). *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69* (6), 1251–1303.
- (2) Cohen, S. M. New Approaches for Medicinal Applications of Bioinorganic Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11* (2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.012>.
- (3) Benite, A. M. C.; Química, I. De; Goiás, U. F. De; Samambaia, C. I. I.; Go, G.; Machado, S. D. P. Artigo Gerais. **2007**, *30* (8), 2062–2067.
- (4) Orvig, C.; Abrams, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2201–2204.
- (5) Bruijninx, P. C.; Sadler, P. J. New Trends for Metal Complexes with Anticancer Activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (2), 197–206.
- (6) Henrique Eisi Toma. *Química Bioinorgânica e Ambiental Coleção de Química Conceitual*, 1º.; Editora Blucher, Ed.; 2015.
- (7) Guo, Z.; Sadler, P. J. Metals in Medicine. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (11), 1512–1531.
- (8) Shriver, D. F., Atkins, P. W. *Química Inorgânica*, 3ª ed.; 2008.
- (9) Mustafa, S.; Rao, B. U.; SurendraBabu, M. S.; Raju, K. K.; Rao, G. N. Synthesis, Characterization, and Biological Activities of Pendant Arm-Pyridyltetrazole Copper(II) Complexes: DNA Binding/Cleavage Activity and Cytotoxic Studies. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12* (10), 1516–1534.
- (10) Ferraz, K. S. O.; Silva, N. F.; Da Silva, J. G.; Speziali, N. L.; Mendes, I. C.; Beraldo, H. Structural Studies on Acetophenone- and Benzophenone-Derived Thiosemicarbazones and Their Zinc(II) Complexes. *J. Mol. Struct.* **2012**, *1008*, 102–107.
- (11) Maurya, M. R.; Kumar, A.; Bhat, A. R.; Azam, A.; Bader, C.; Rehder, D. Dioxo- and Oxovanadium (V) Complexes of Thiohydrazone ONS Donor Ligands: Synthesis, Characterization, Reactivity, and Antiamoebic Activity. **2006**, *45* (3), 629–633.
- (12) Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, C. A. M. e C. L. D. M. T. P. L. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. *EXCLI J.* **2005**, *28* (1), 118–129.
- (13) Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. No Title <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp> (accessed Jun 9, 2019).
- (14) Casas, J. S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. Main Group Metal Complexes of Semicarbazones and Thiosemicarbazones. A Structural Review. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209* (1), 197–261.
- (15) Lessa, J. A.; Mendes, I. C.; Da Silva, P. R. O.; Soares, M. A.; Dos Santos, R. G.; Speziali, N. L.; Romeiro, N. C.; Barreiro, E. J.; Beraldo, H. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones: Cytotoxic Activity in Nanomolar Doses against Malignant Gliomas. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 5671–5677.
- (16) Zhao, Z.; Shi, Z.; Liu, M.; Liu, X. Microwave-Assisted Synthesis and in Vitro Antibacterial Activity of Novel Steroidal Thiosemicarbazone Derivatives. *Bioorg. Med.*

- Chem. Lett.* **2012**, 22 (24), 7730–7734.
- (17) Li, M. X.; Chen, C. L.; Zhang, D.; Niu, J. Y.; Ji, B. S. Mn(II), Co(II) and Zn(II) Complexes with Heterocyclic Substituted Thiosemicarbazones: Synthesis, Characterization, X-Ray Crystal Structures and Antitumor Comparison. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (7), 3169–3177.
- (18) Klayman, D. L.; Scovill, J. P.; Bartosevich, J. F.; Bruce, J. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones. 5. 1-[1-(2-Pyridyl)Ethyl]-3-Thiosemicarbazides as Potential Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **1983**, 26 (1), 35–39.
- (19) Bukowski, L.; Zwolska, Z.; Diseases, P. Synthesis and Antituberculotic Activity of Some New Imidazo[4,5-. **2006**, 42 (10), 1358–1365.
- (20) Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; De Lima, J. G.; De Faria, A. R.; Alves, A. J.; De Aquino, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. *Quim. Nova* **2005**, 28 (6), 1030–1037.
- (21) Temperini, M. L. .; dos Santos, M. .; Paoli Monteiro, V. . Spectroscopic Study of the Isomerization of Z- to E-Pyridine-2-Formyl Thiosemicarbazone. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, 51 (9), 1517–1524.
- (22) Pedro, P. I.; Nguyen, H. H.; Ponader, D.; Hagenbach, A.; Bergemann, S.; Gust, R.; Deflon, V. M.; Abram, U. Neutral Gold Complexes with Tridentate SNS Thiosemicarbazide Ligands. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (3), 1604–1613.
- (23) Oliveira, C. G.; Miyata, M.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Almeida, E. T. De; Deflon, V. M. Cobalt(III) Complexes with Thiosemicarbazones as Potential Anti-. **2014**, 25 (10), 1848–1856.
- (24) Pavan, F. R.; Maia, P. I. d. S.; Leite, S. R. A.; Deflon, V. M.; Batista, A. A.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; Leite, C. Q. F. Thiosemicarbazones, Semicarbazones, Dithiocarbazates and Hydrazide/Hydrazones: Anti - Mycobacterium Tuberculosis Activity and Cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (5), 1898–1905.
- (25) Finch, R. a; Liu, M.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Cheng, Y.; Sartorelli, a C. Triapine (3-Aminopyridine-2-Carboxaldehyde- Thiosemicarbazone): A Potent Inhibitor of Ribonucleotide Reductase Activity with Broad Spectrum Antitumor Activity. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 59 (8), 983–991.
- (26) Enyedy, É. A.; Zsigó, É.; Nagy, N. V.; Kowol, C. R.; Roller, A.; Keppler, B. K.; Kiss, T. Complex-Formation Ability of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone towards Zn II , Cu II , Fe II , Fe III and Ga III Ions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2012 (25), 4036–4047.
- (27) Chellan, P.; Stringer, T.; Shokar, A.; Dornbush, P. J.; Vazquez-Anaya, G.; Land, K. M.; Chibale, K.; Smith, G. S. Synthesis and in Vitro Evaluation of Palladium(II) Salicylaldiminato Thiosemicarbazone Complexes against *Trichomonas Vaginalis*. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, 105 (12), 1562–1568.
- (28) Pereira, F. D. C.; Lima, B. A. V.; De Lima, A. P.; Pires, W. C.; Monteiro, T.; Magalhães, L. F.; Costa, W.; Graminha, A. E.; Batista, A. A.; Ellena, J.; et al. cis-[RuCl(BzCN) (bipy) (dppe)]PF₆ induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in Ehrlich tumor cells. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 149, 91–101.
- (29) Quiroga, A. G.; Cubo, L.; Sanz Miguel, P. J.; Moneo, V.; Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C. Isolation of an Intermediate in the Platination of P-Nitroacetophenone 4-Methylthiosemicarbazone: Potential Application as an Antitumor Drug. *Eur. J. Inorg.*

- Chem.* **2008**, No. 8, 1183–1187.
- (30) Ivanović, I.; Gligorijević, N.; Arandelović, S.; Radulović, S.; Roller, A.; Keppler, B. K.; Tešić, Ž. L.; Grgurić-Šipka, S. New Ruthenium(II)-Arene Complexes Bearing Hydrazides and the Corresponding (Thio)Semicarbazones of 3- and 4-Acetylpyridine: Synthesis, Characterization, Crystal Structure Determination and Antiproliferative Activity. *Polyhedron* **2013**, *61* (3), 112–118.
- (31) Castiñeiras, A.; Fernández-Hermida, N.; García-Santos, I.; Gómez-Rodríguez, L. Neutral Ni^{II}, Pd^{II} and Pt^{II} ONS-Pincer Complexes of 5-Acetylbarbituric-4N-Dimethylthiosemicarbazone: Synthesis, Characterization and Properties. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (43), 13486–13495.
- (32) Shao, J.; Ma, Z.-Y.; Li, A.; Liu, Y.-H.; Xie, C.-Z.; Qiang, Z.-Y.; Xu, J.-Y. Thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) Complexes as Potential Anticancer Agents: Syntheses, Crystal Structure, DNA Cleavage, Cytotoxicity and Apoptosis Induction Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *136*, 13–23.
- (33) Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Van Rijn, J.; Verschoor, G. C. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds Containing Nitrogen-Sulphur Donor Ligands; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[1,7-Bis(N-Methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-Dithiaheptane]Copper(II) Perchlorate. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1984**, No. 7, 1349–1356.
- (34) Akbar Ali, M.; Mirza, A. H.; Butcher, R. J.; Bernhardt, P. V.; Karim, M. R. Self-Assembling Dicopper(II) Complexes of Di-2-Pyridyl Ketone Schiff Base Ligands Derived from S-Alkyldithiocarbazates. *Polyhedron* **2011**, *30* (9), 1478–1486.
- (35) Mokhtaruddin, N. S. M.; Yusof, E. N. M.; Ravoof, T. B. S. A.; Tiekink, E. R. T.; Veerakumarasivam, A.; Tahir, M. I. M. Unusual Saccharin-N,O (Carbonyl) Coordination in Mixed-Ligand Copper(II) Complexes: Synthesis, X-Ray Crystallography and Biological Activity. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1139*, 1–9.
- (36) Schild-Hay, L. J.; Leil, T. A.; Divi, R. L.; Olivero, O. A.; Weston, A.; Poirier, M. C. Tamoxifen Induces Expression of Immune Response-Related Genes in Cultured Normal Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* **2009**, *69* (3), 1150–1155.
- (37) Casas, J. S.; Couce, M. D.; Sordo, J. Coordination Chemistry of Vitamin B6 and Derivatives: A Structural Overview. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (23–24), 3036–3062.
- (38) Pandey, S.; Garg, P.; Lim, K. T.; Kim, J.; Choung, Y. H.; Choi, Y. J.; Choung, P. H.; Cho, C. S.; Chung, J. H. The Efficiency of Membrane Transport of Vitamin B6 Coupled to Poly(Ester Amine) Gene Transporter and Transfection in Cancer Cells. *Biomaterials* **2013**, *34* (14), 3716–3728.
- (39) Pandey, S.; Garg, P.; Lee, S.; Choung, H. W.; Choung, Y. H.; Choung, P. H.; Chung, J. H. Nucleotide Biosynthesis Arrest by Silencing SHMT1 Function via Vitamin B6-Coupled Vector and Effects on Tumor Growth Inhibition. *Biomaterials* **2014**, *35* (34), 9332–9342. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.045>.
- (40) Banerjee, S.; Prasad, P.; Khan, I.; Hussain, A.; Kondaiah, P.; Chakravarty, A. R. Mitochondria Targeting Photocytotoxic Oxidovanadium(IV) Complexes of Curcumin and (Acridinyl)Dipyridophenazine in Visible Light. *Zeitschrift fur Anorg. und Allg. Chemie* **2014**, *640* (6), 1195–1204.
- (41) Tang, H. A.; Wang, L. F.; Yang, R. D. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activities of Manganese(II), Cobalt(II), Nickel(II), Copper(II) and Zinc(II) Complexes

- with Soluble Vitamin K3 Thiosemicarbazone. *Transit. Met. Chem.* **2003**, 28 (4), 395–398.
- (42) Rane, S.; Ahmed, K.; Salunke-Gawali, S.; Zaware, S. B.; Srinivas, D.; Gonnade, R.; Bhadbhade, M. Vitamin K 3 Family Members - Part II: Single Crystal X-Ray Structures, Temperature-Induced Packing Polymorphism, Magneto-Structural Correlations and Probable Anti-Oncogenic Candidature. *J. Mol. Struct.* **2008**, 892 (1–3), 74–83.
- (43) Affan, M. A., Chee, D. N. A., Ahmad, F. B., Ismail, J., Mohd. Yamin, B., & Hitam, R. B. Synthesis, Characterization and Biological Activities of Organotin(IV) Complexes with Vitamin K3-2-Hydrazinopyridine: X-Ray Crystal Structure of Vitamin K3-2-Hydrazinopyridine [VHzP]. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2014**, 1 (4), 158–172.
- (44) Zaitseva, A. S.; Arlyapov, V. A.; Yudina, N. Y.; Alferov, S. V.; Reshetilov, A. N. Use of One- and Two-Mediator Systems for Developing a BOD Biosensor Based on the Yeast *Debaryomyces Hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* **2017**, 98, 43–51.
- (45) Yousef Ebrahimipour, S.; Sheikhshoae, I.; Crochet, A.; Khaleghi, M.; Fromm, K. M. A New Mixed-Ligand Copper(II) Complex of (E)-N'-(2-Hydroxybenzylidene) Acetohydrazide: Synthesis, Characterization, NLO Behavior, DFT Calculation and Biological Activities. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1072 (1), 267–276.
- (46) Alagesan, M.; Bhuvanesh, N. S. P.; Dharmaraj, N. Potentially Cytotoxic New Copper(I) Hydrazone Complexes: Synthesis, Crystal Structure and Biological Properties. *Dalt. Trans.* **2013**, 42 (19), 7210–7223.
- (47) Sutradhar, M.; Kirillova, M. V.; Guedes Da Silva, M. F. C.; Liu, C. M.; Pombeiro, A. J. L. Tautomeric Effect of Hydrazone Schiff Bases in Tetranuclear Cu(I) Complexes: Magnetism and Catalytic Activity towards Mild Hydrocarboxylation of Alkanes. *Dalt. Trans.* **2013**, 42 (47), 16578–16587.
- (48) Kathawate, L.; Shinde, Y.; Yadav, R.; Kasabe, U.; Nikalje, M.; Salunke-Gawali, S. Thermal and Spectral Properties of Alkali Metal Complexes of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2013**, 115 (3), 2319–2330.
- (49) Manikandan, R.; Viswanathamurthi, P.; Muthukumar, M. Ruthenium(II) Hydrazone Schiff Base Complexes: Synthesis, Spectral Study and Catalytic Applications. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, 83 (1), 297–303.
- (50) Gao, J.; Richardson, D. R. The Potential of Iron Chelators of the Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Class as Effective Antiproliferative Agents, IV: The Mechanisms Involved in Inhibiting Cell-Cycle Progression. *Blood* **2001**, 98 (3), 842–850.
- (51) Manikandan, R.; Vijayan, P.; Anitha, P.; Prakash, G.; Viswanathamurthi, P.; Butcher, R. J.; Velmurugan, K.; Nandhakumar, R. Synthesis, Structure and in Vitro Biological Activity of Pyridoxal N(4)-Substituted Thiosemicarbazone Cobalt(III) Complexes. *Inorganica Chim. Acta* **2014**, 421, 80–90.
- (52) Tseng, T.-Y.; Chu, I.-T.; Lin, S.-J.; Li, J.; Chang, T.-C. Binding of Small Molecules to G-Quadruplex DNA in Cells Revealed by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of o-BMVC Foci. *Molecules* **2018**, 24 (1), 35.
- (53) Ramachandran, E.; Thomas, S. P.; Poornima, P.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R.; Padma, V. V.; Natarajan, K. Evaluation of DNA Binding, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Mononuclear Co(III) Complexes of 2-Oxo-1,2-Dihydrobenzo[h]Quinoline-3-Carbaldehyde Thiosemicarbazones. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 50, 405–415.
- (54) Casas, J. S.; Castellano, E. E.; Couce, M. D.; Ellena, J.; Sánchez, A.; Sordo, J.; Taboada, C. A Gold(I) Complex with a Vitamin K3 Derivative: Characterization and Antitumoral

- Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (11), 1858–1860.
- (55) Iakovidis, I.; Delimaris, I.; Piperakis, S. M. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Mol. Biol. Int.* **2011**, *2011*, 1–13.
- (56) Ferrari, M. B.; Fava, G. G.; Tarasconi, P.; Albertini, R.; Pinelli, S.; Starcich, R. Synthesis, Spectroscopic and Structural Characterization, and Biological Activity of Aquachloro(Pyridoxal Thiosemicarbazone) Copper(II) Chloride. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *53* (1), 13–25.
- (57) Ferrari, M. B.; Fava, G. G.; Pelizzi, C.; Pelosi, G.; Tarasconi, P. Synthetic, Spectroscopic and X-Ray Crystallographic Studies on Copper(II) Complexes with Pyruvic Acid and Pyridoxal Thiosemicarbazones. *Inorganica Chim. Acta* **1998**, *269* (2), 297–301.
- (58) Ferrari, M. B.; Bisceglie, F.; Pelosi, G.; Tarasconi, P.; Albertini, R.; Dall’Aglia, P. P.; Pinelli, S.; Bergamo, A.; Sava, G. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Copper Complexes with Pyridoxal Thiosemicarbazone Derivatives. X-Ray Crystal Structure of Three Dimeric Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (2), 301–312.
- (59) Sheldrick, G. M. A Short History of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64* (1), 112–122.
- (60) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, *71* (1), 3–8.
- (61) Farrugia, L. J. ORTEP-3 for Windows - A Version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30* (5), 565.
- (62) Farrugia, L. J. WinGX Suite for Small-Molecule Single-Crystal Crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32* (4), 837–838.
- (63) K Brandenburg, M. B. DIAMOND - Crystal and Molecular Structure Visualization. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany 1999.
- (64) Cousins, K. R. ChemDraw Ultra 9.0. CambridgeSoft, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140. www.cambridgesoft.com. See Web Site for Pricing Options. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 4115–4116.
- (65) Hu, Y.; Li, C.; Wang, X.; Yang, Y.; Zhu, H. 1,3,4-Thiadiazole: Synthesis, Reactions, and Applications in Medicinal, Agricultural, and Materials Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (10), 5572–5610.
- (66) De Lima, A. P.; De Castro Pereira, F.; Vilanova-Costa, C. A. S. T.; De Santana Braga Barbosa Ribeiro, A.; Pavanin, L. A.; Dos Santos, W. B.; De Paula Silveira-Lacerda, E. The Ruthenium Complex Cis-(Dichloro)Tetrammineruthenium(III) Chloride Induces Apoptosis and Damages DNA in Murine Sarcoma 180 Cells. *J. Biosci.* **2010**, *35* (3), 371–378..
- (67) Bronikowska, J.; Szliszka, E.; Jaworska, D.; Czuba, Z. P.; Krol, W. The Coumarin Psoralidin Enhances Anticancer Effect of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *Molecules* **2012**, *17* (6), 6449–6464.
- (68) Syed Abdul Rahman, S. N.; Abdul Wahab, N.; Abd Malek, S. N. In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma Zedoaria*. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 1–14.
- (69) Rogalska, A.; Gajek, A.; Marczak, A. Analysis of Epothilone B-Induced Cell Death in Normal Ovarian Cells. *Cell Biol. Int.* **2013**, *37* (12), 1330–1339.

- (70) Lima, A. P.; Pereira, F. C.; Almeida, M. A. P.; Mello, F. M. S.; Pires, W. C.; Pinto, T. M.; Delella, F. K.; Felisbino, S. L.; Moreno, V.; Batista, A. A.; et al. Cytotoxicity and Apoptotic Mechanism of Ruthenium(II) Amino Acid Complexes in Sarcoma-180 Tumor Cells. *PLoS One* **2014**.
- (71) Hamid, M. H. S. A.; Said, A. N. A. H.; Mirza, A. H.; Karim, M. R.; Arifuzzaman, M.; Akbar Ali, M.; Bernhardt, P. V. Synthesis, Structures and Spectroscopic Properties of Some Tin(IV) Complexes of the 2-Acetylpyrazine Schiff Bases of S-Methyl- and S-Benzylthiocarbazates. *Inorganica Chim. Acta* **2016**, 453.
- (72) Haddad, A. Z.; Cronin, S. P.; Mashuta, M. S.; Buchanan, R. M.; Grapperhaus, C. A. Metal-Assisted Ligand-Centered Electrocatalytic Hydrogen Evolution upon Reduction of a Bis(Thiosemicarbazonato)Cu(II) Complex. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (18), 11254–11265.
- (73) Low, M. L.; Maigre, L.; Tahir, M. I. M.; Tiekink, E. R. T.; Dorlet, P.; Guillot, R.; Ravoof, T. B.; Rosli, R.; Pagès, J. M.; Policar, C.; et al. New Insight into the Structural, Electrochemical and Biological Aspects of Macroacyclic Cu(II) Complexes Derived from S-Substituted Dithiocarbazate Schiff Bases. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 120, 1–12.
- (74) Ravoof, T. B. S. A.; Crouse, K. A.; Tiekink, E. R. T.; Tahir, M. I. M.; Yusof, E. N. M.; Rosli, R. Synthesis, Characterisation and Biological Activities of S-2- or S-4-Methylbenzyl- β -N-(Di-2-Pyridyl)Methylenedithiocarbazate and Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) Complexes. *Polyhedron* **2017**, 133 (ii), 383–392.
- (75) Leovac, V. M.; Jevtović, V. S.; Jovanović, L. S.; Bogdanović, G. A. Metal Complexes with Schiff-Base Ligands - Pyridoxal and Semicarbazide-Based Derivatives. *J. Serbian Chem. Soc.* **2005**, 70 (3), 393–422.
- (76) Geary, W. J. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, 7 (1), 81–122.
- (77) Hahn, T. *The International Union of Crystallography*, 2^o ed.; Company, D. R. P., Ed.; Dordrecht, Holland/Boston, USA., 1987.
- (78) Venugopal, R.; Sreejith, S. S.; Kurup, M. R. P. Crystallographic, Spectroscopic and Theoretical Investigations on Ni(II) Complexes of a Tridentate NNS Donor Thiosemicarbazone. *Polyhedron* **2019**, 158, 398–407.
- (79) Mohamed Subarkhan, M.; Prabhu, R. N.; Raj Kumar, R.; Ramesh, R. Antiproliferative Activity of Cationic and Neutral Thiosemicarbazone Copper(II) Complexes. *RSC Adv.* **2016**, 6 (30), 25082–25093.
- (80) Jakusch, T.; Kozma, K.; Enyedy, É. A.; May, N. V.; Roller, A.; Kowol, C. R.; Keppler, B. K.; Kiss, T. Complexes of Pyridoxal Thiosemicarbazones Formed with Vanadium(IV/V) and Copper(II): Solution Equilibrium and Structure. *Inorganica Chim. Acta* **2018**, 472, 243–253.
- (81) Nanjundan, N.; Narayanasamy, R.; Butcher, R. J.; Jasinski, J. P.; Velmurugan, K.; Nandhakumar, R.; Balakumaran, M. D.; Kalaichelvan, P. T.; Gnanasoundari, V. G. Synthesis, Crystal Structure, Biomolecular Interactions and Anticancer Properties of Ni(II), Cu(II) and Zn(II) Complexes Bearing S-Allyldithiocarbazate. *Inorganica Chim. Acta* **2017**, 455, 283–297.
- (82) Nanjundan, N.; Narayanasamy, R.; Geib, S.; Velmurugan, K.; Nandhakumar, R.; Balakumaran, M. D.; Kalaichelvan, P. T. Distorted Tetrahedral Bis-(N,S) Bidentate Schiff Base Complexes of Ni(II), Cu(II) and Zn(II): Synthesis, Characterization and Biological Studies. *Polyhedron* **2016**, 110, 203–220.

- (83) Mandal, S.; Naskar, B.; Modak, R.; Sikdar, Y.; Chatterjee, S.; Biswas, S.; Mondal, T. K.; Modak, D.; Goswami, S. Syntheses, Crystal Structures, Spectral Study and DFT Calculation of Three New Copper(II) Complexes Derived from Pyridoxal Hydrochloride, N,N-Dimethylethylenediamine and N,N-Diethylethylenediamine. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1088*, 38–49.
- (84) Piri, Z.; Moradi-Shoeili, Z.; Assoud, A. New Copper(II) Complex with Bioactive 2-Acetylpyridine-4N-p-Chlorophenylthiosemicarbazone Ligand: Synthesis, X-Ray Structure, and Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activity. *Inorg. Chem. Commun.* **2017**, *84* (Ii), 122–126.
- (85) Ma, Z. Y.; Shao, J.; Bao, W. G.; Qiang, Z. Y.; Xu, J. Y. A Thiosemicarbazone Copper(II) Complex as a Potential Anticancer Agent. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (2), 277–294.
- (86) Azarkish, M.; Akbari, A.; Sedaghat, T.; Simpson, J. Ternary Complexes of Zn(II) and Cu(II) with 1-((2-Hydroxynaphthalen-1-Yl)Methylene)-4-Phenylthiosemicarbazide in the Presence of Heterocyclic Bases as Auxiliary Ligands: Synthesis, Spectroscopic and Structural Characterization and Antibacterial Activity. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1156*, 34–42.
- (87) Takjoo, R.; Centore, R.; Hakimi, M.; Ali Beyramabadi, S.; Morsali, A. S-Allyl-3-(2-Pyridyl-Methylene)Dithiocarbazate Ligand and Its Manganese(II), Cobalt(III) and Nickel(II) Complexes. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *371* (1), 36–41.
- (88) Dobrova, A.; Platzer, S.; Bacher, F.; Milunovic, M. N. M.; Dobrov, A.; Spengler, G.; Enyedy, É. A.; Novitchi, G.; Arion, V. B. Structure-Antiproliferative Activity Studies on l-Proline- and Homoproline-4-: N -Pyrrolidine-3-Thiosemicarbazone Hybrids and Their Nickel(II), Palladium(II) and Copper(II) Complexes. *Dalt. Trans.* **2016**, *45* (34), 13427–13439.
- (89) Gatto, C. C.; Miguel, P. M.; Almeida, C. M.; Santiago, P. H. O.; Paier, C. R. K.; Pessoa, C. A Copper(II) Complex of a Semicarbazone: Crystal Structure, Spectroscopic Analysis and Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines. *Transit. Met. Chem.* **2017**, *42* (6).
- (90) Low, M. L.; Paulus, G.; Dorlet, P.; Guillot, R.; Rosli, R.; Delsuc, N.; Crouse, K. A.; Policar, C. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Cu(II), Zn(II) and Re(I) Complexes Derived from S-Benzylthiocarbazate and 3-Acetylcoumarin. *BioMetals* **2015**, *28* (3), 553–566.
- (91) Mello-Andrade, F.; da Costa, W. L.; Pires, W. C.; Pereira, F. de C.; Cardoso, C. G.; Lino-Junior, R. de S.; Irusta, V. R. C.; Carneiro, C. C.; de Melo-Reis, P. R.; Castro, C. H.; et al. Antitumor Effectiveness and Mechanism of Action of Ru(II)/Amino Acid/Diphosphine Complexes in the Peritoneal Carcinomatosis Progression. *Tumor Biol.* **2017**, *39* (10), 1–18.
- (92) Liu, Y.-H.; Li, A.; Shao, J.; Xie, C.-Z.; Song, X.-Q.; Bao, W.-G.; Xu, J.-Y. Four Cu(II) Complexes Based on Antitumor Chelators: Synthesis, Structure, DNA Binding/Damage, HSA Interaction and Enhanced Cytotoxicity. *Dalt. Trans.* **2016**, *45* (19), 8036–8049.
- (93) Garibal, J.; Hollville, É.; Renouf, B.; Tétaud, C.; Wiels, J. Caspase-8-Mediated Cleavage of Bid and Protein Phosphatase 2A-Mediated Activation of Bax Are Necessary for Verotoxin-1-Induced Apoptosis in Burkitt's Lymphoma Cells. *Cell. Signal.* **2010**, *22* (3), 467–475.
- (94) P.P., S.; W., G.; J.N., S.; A.M.D.C., F.; T., B.; F.L., F.; H., T.; A., N. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (14), 6414–6424.

- (95) Xiong, Y.; Hannon, G. J.; Zhang, H.; Casso, D.; Kobayashi, R.; Beach, D. P21 Is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases. *Nature* **1993**, *366* (6456), 701–704.
- (96) Porter, A. G.; Jänicke, R. U. Emerging Roles of Caspase-3 in Apoptosis. *Cell Death Differ.* **1999**, *6* (2), 99–104.
- (97) Badave, K.; Patil, Y.; Gonnade, R.; Srinivas, D.; Dasgupta, R.; Khan, A.; Rane, S. Azide Derivatized Anticancer Agents of Vitamin K3: X-Ray Structural, DSC, Resonance Spectral and API Studies. *J. Mol. Struct.* **2011**, *1006* (1–3), 288–296.
- (98) Patil, A.; Lande, D. N.; Nalkar, A.; Gejji, S. P.; Rangel, M. Binding Selectivity of Vitamin K3 Based Chemosensors towards Nickel (II) and Copper (II) Metal Ions. **2017**, *1143*.
- (99) Beraldo, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O Amplo Perfil Farmacológico e Usos Clínicos. *Quim. Nova* **2004**, *27* (3), 461–471.
- (100) Akladios, F. N.; Andrew, S. D.; Parkinson, C. J. Investigation of the Cytotoxic Implications of Metal Chelators against Melanoma and Approaches to Improve the Cytotoxicity Profiles of Metal Coordinating Agents. *BioMetals* **2016**, *29* (5), 789–805.
- (101) Bouhadir, K.; Atallah, H.; Mezher, R.; Fatfat, M.; Gali-Muhtasib, H.; Elaridi, J. Synthesis and Biological Assessment of Novel Acylhydrazone Derivatives of 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone. *Org. Commun.* **2017**, *10* (4), 259–272.
- (102) Firmino, G. S. S.; de Souza, M. V. N.; Pessoa, C.; Lourenco, M. C. S.; Resende, J. A. L. C.; Lessa, J. A. Synthesis and Evaluation of Copper(II) Complexes with Isoniazid-Derived Hydrazones as Anticancer and Antitubercular Agents. *BioMetals* **2016**, *29* (6), 953–963.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos H_2L^1 , H_2L^2 , H_2L^3 , K_3sz e K_3iz .

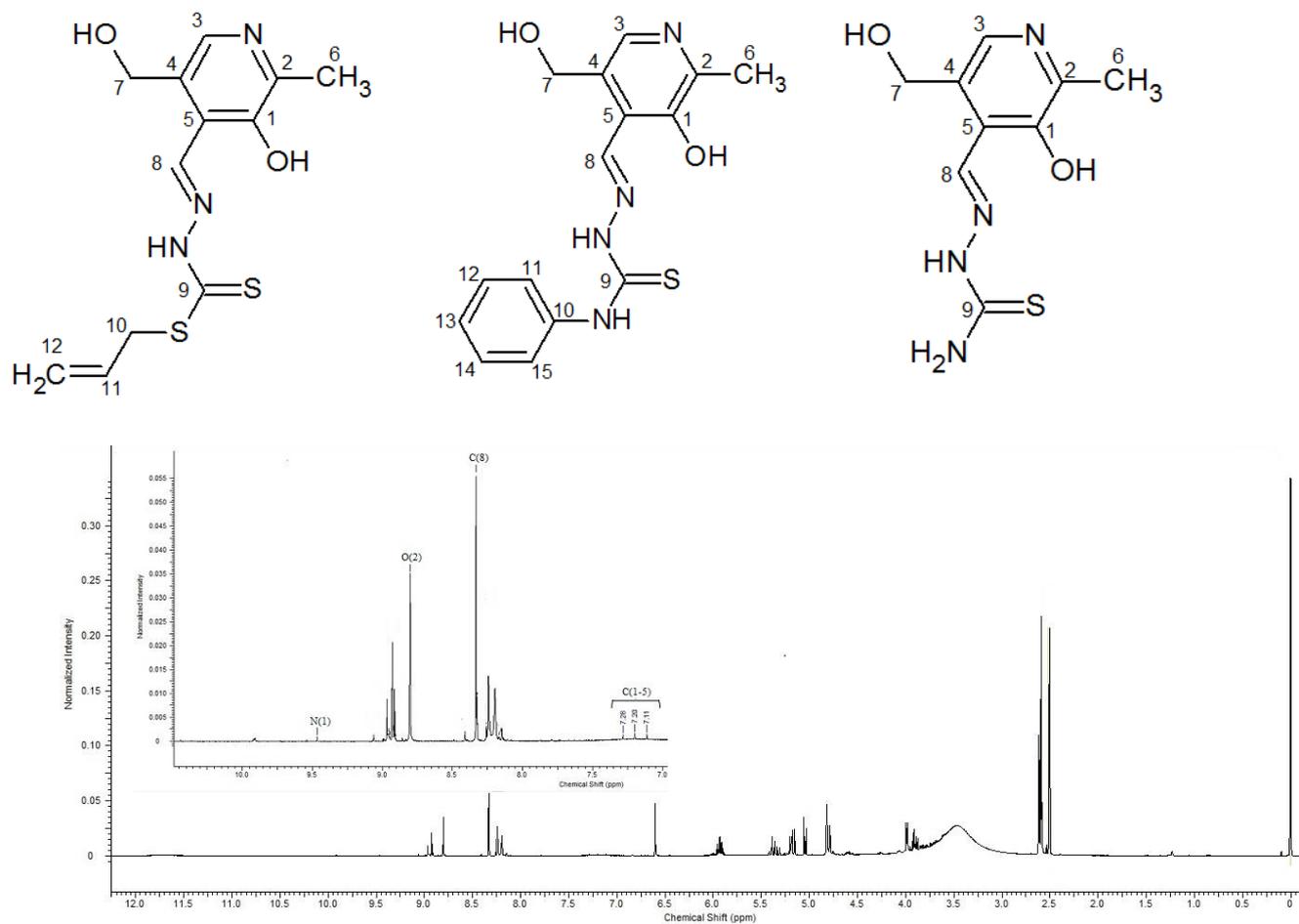


Figura A1. Espectro de ^1H RMN do composto H_2L^1 (DMSO, 600 MHz, RT).

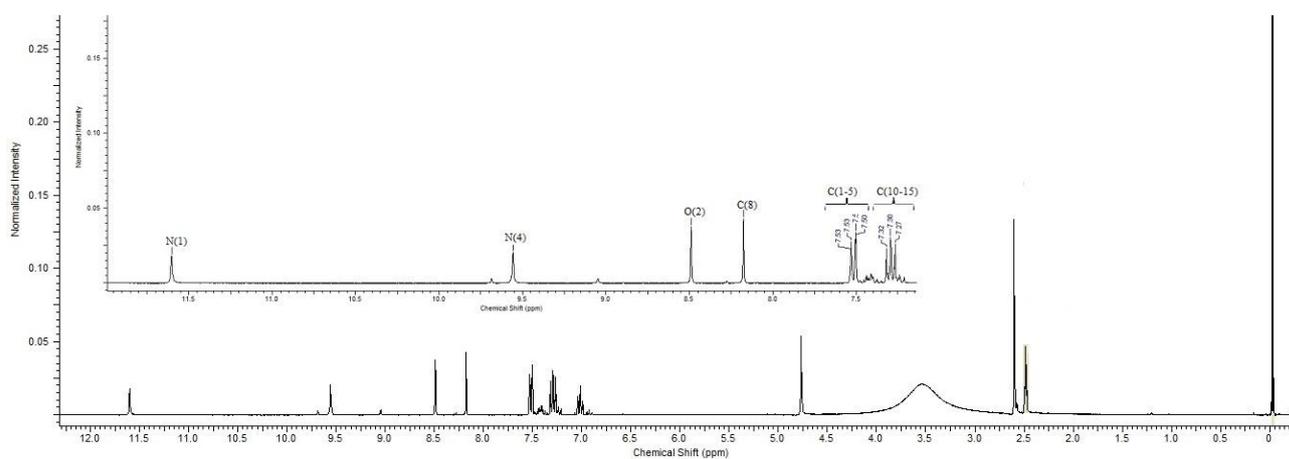


Figura A2. Espectro de ^1H RMN do composto H_2L^2 (DMSO, 600 MHz, RT).

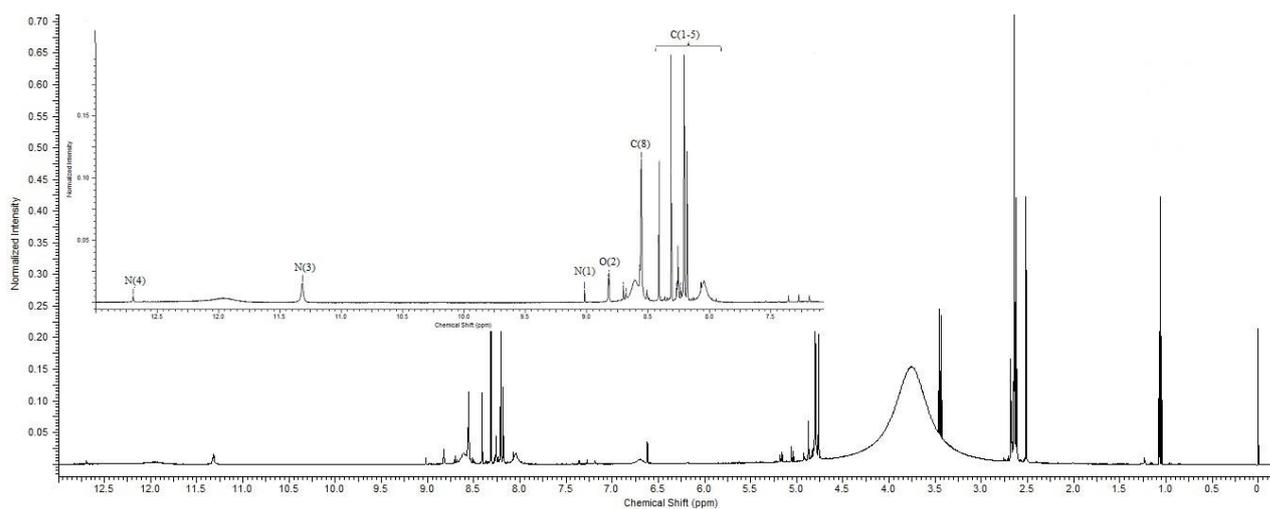


Figura A3. Espectro de ^1H RMN do composto H_2L^3 (DMSO, 600 MHz, RT).

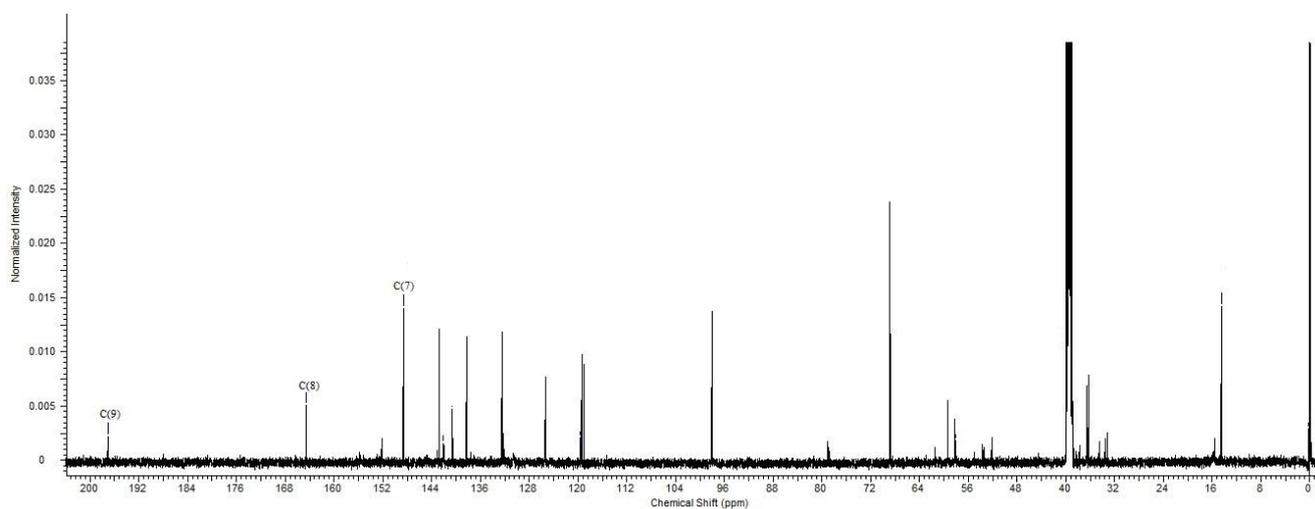


Figura A4. Espectro de ^{13}C RMN do composto H_2L^1 (DMSO, 600 MHz, RT).

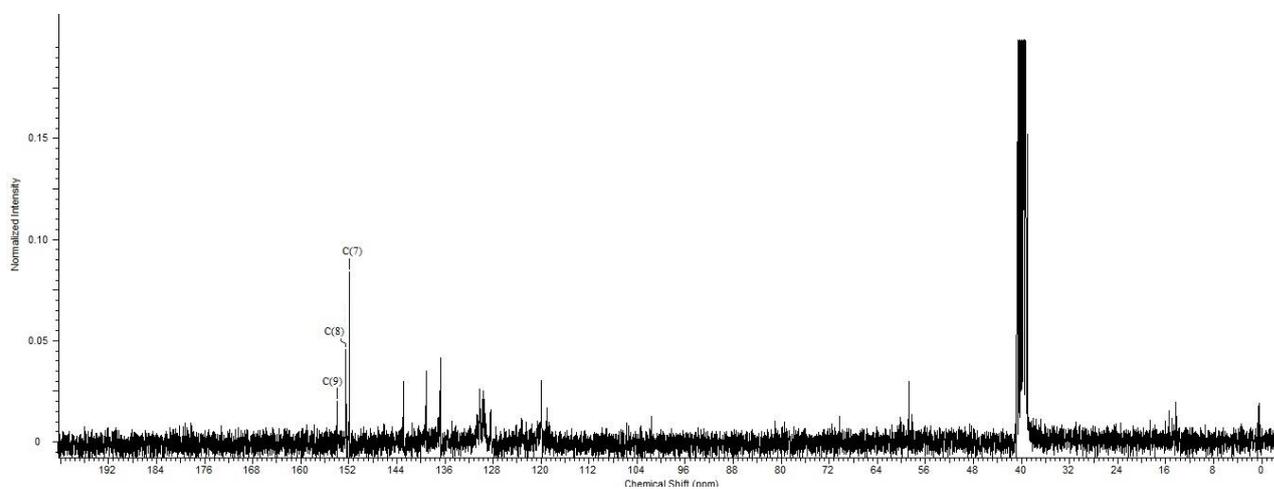


Figura A5. Espectro de ^{13}C RMN do composto H_2L^2 (DMSO, 600 MHz, RT).

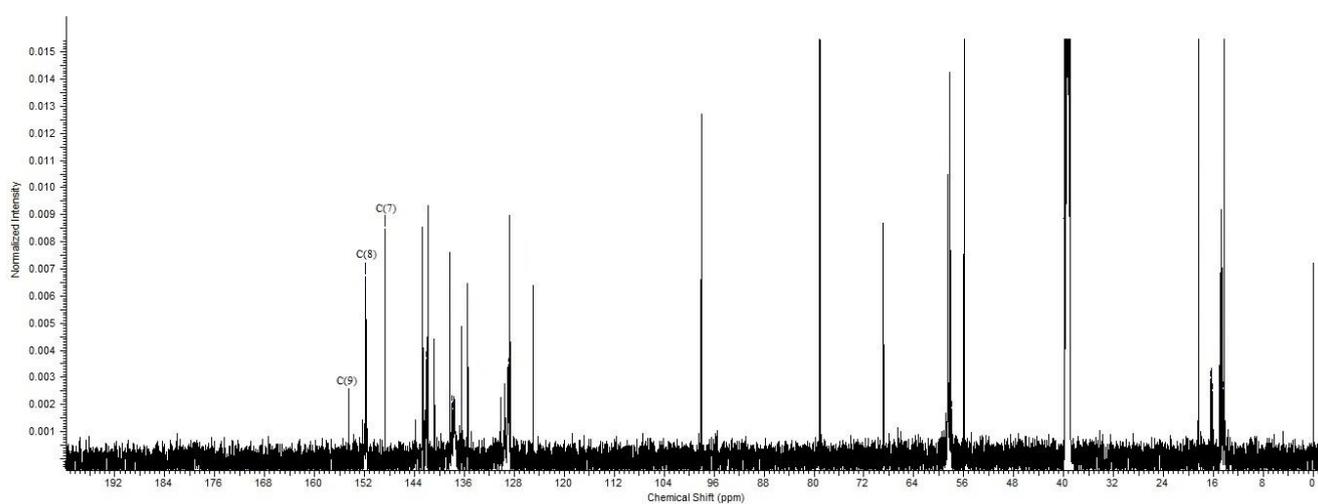


Figura A6. Espectro de ^{13}C RMN do composto H_2L^3 (DMSO, 600 MHz, RT).

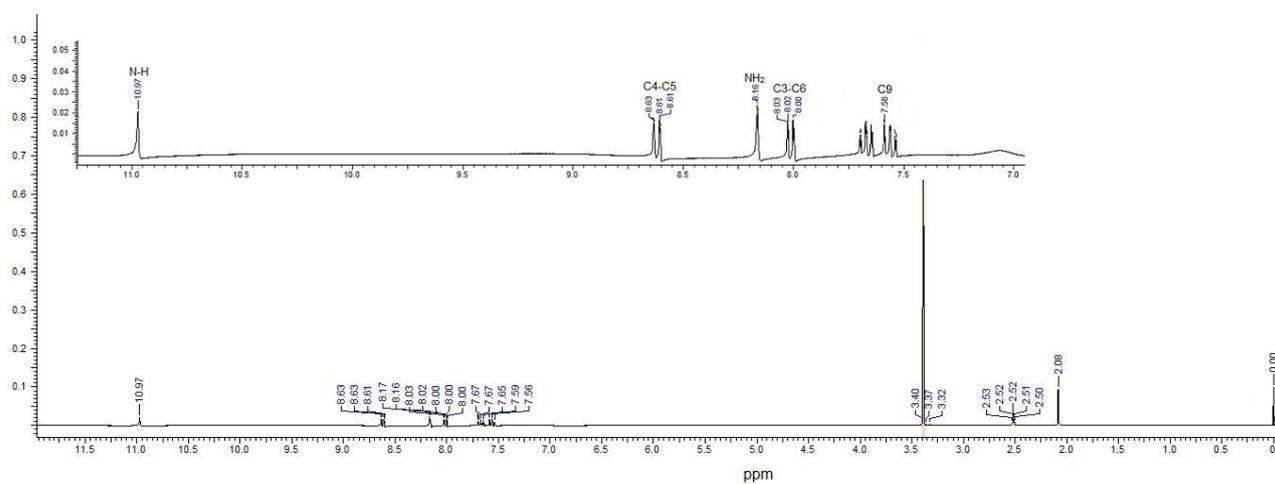
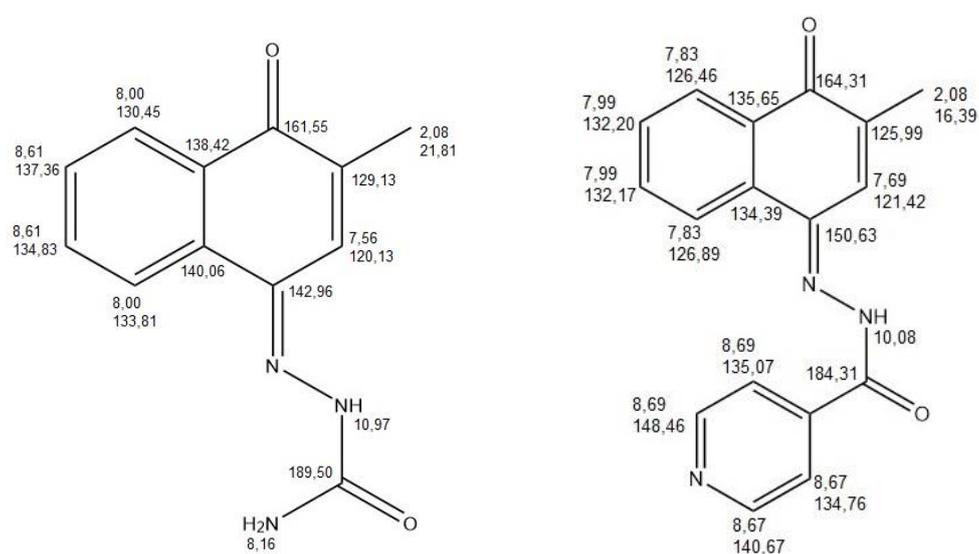


Figura A7. Espectro de ^1H RMN do composto K_3sz (DMSO, 600 MHz, RT).

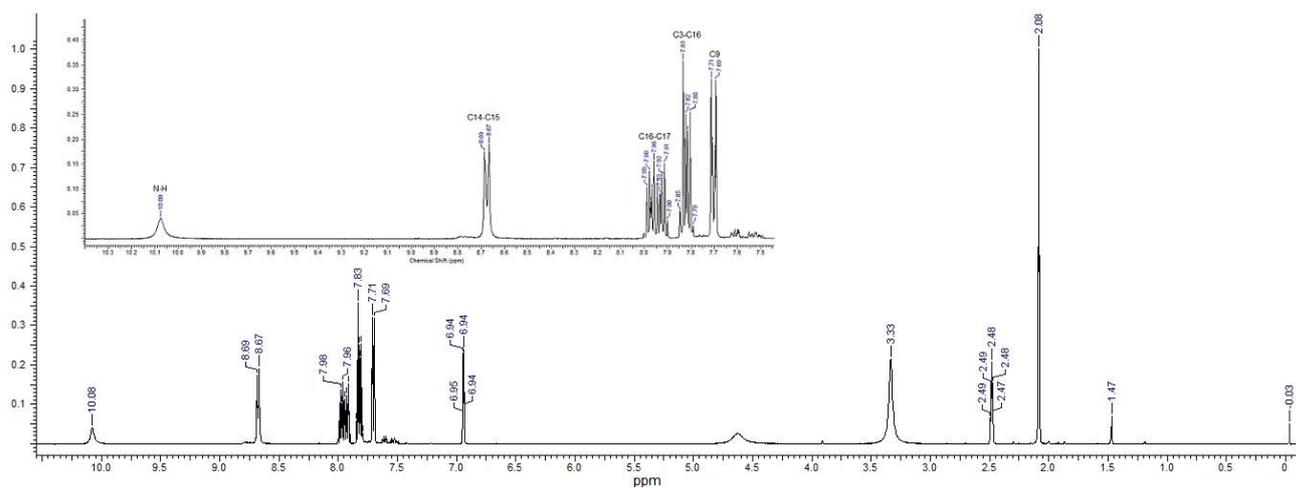


Figura A8. Espectro de ^1H RMN do composto K_3iz (DMSO, 600 MHz, RT).

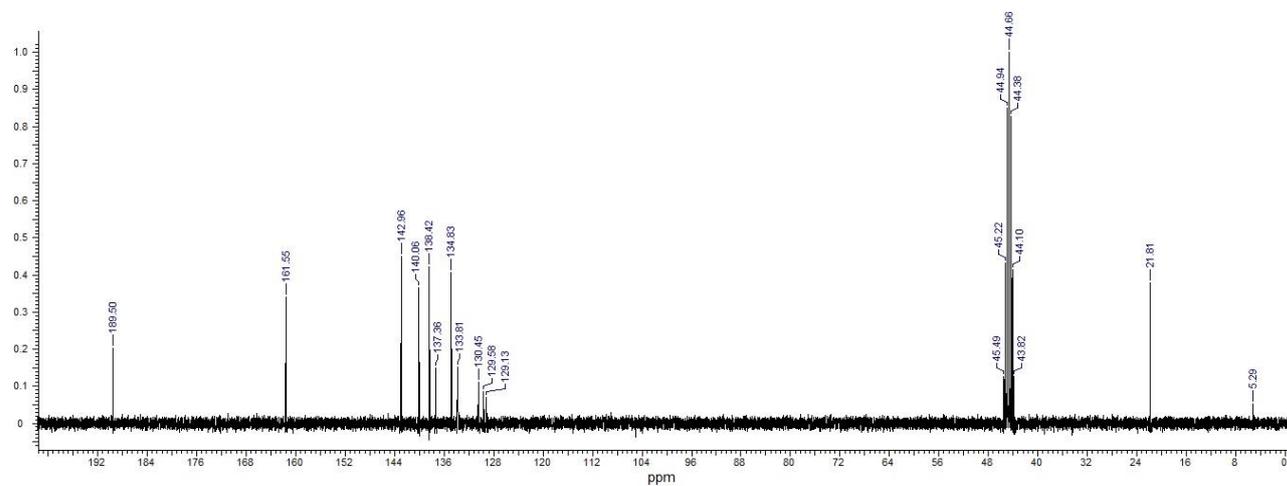


Figura A9. Espectro de ^{13}C RMN do composto K_3iz (DMSO, 600 MHz, RT).

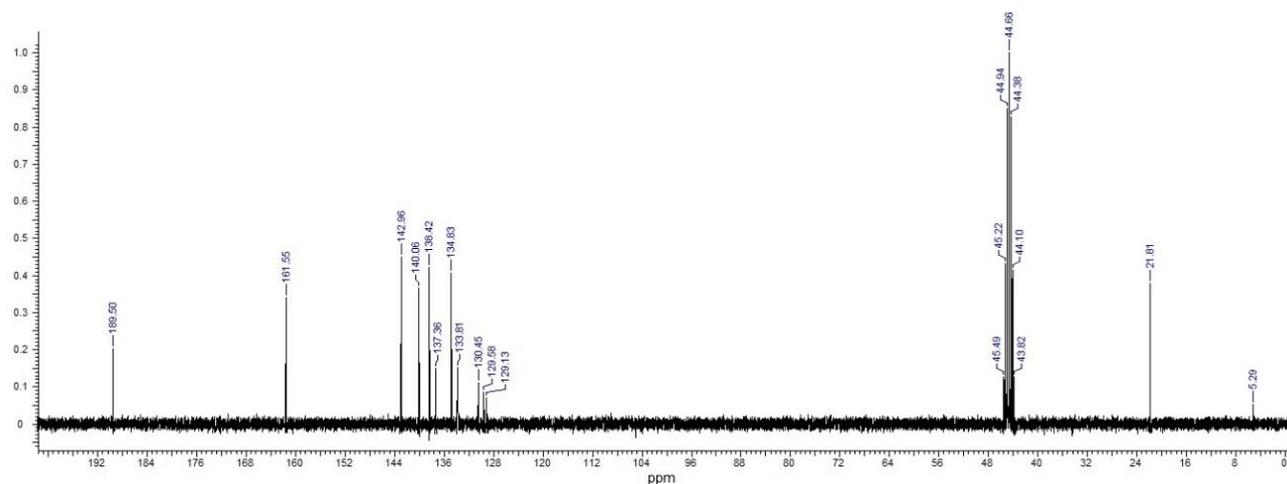


Figura A10. Espectro de ^{13}C RMN do composto K_3sz (DMSO, 600 MHz, RT).

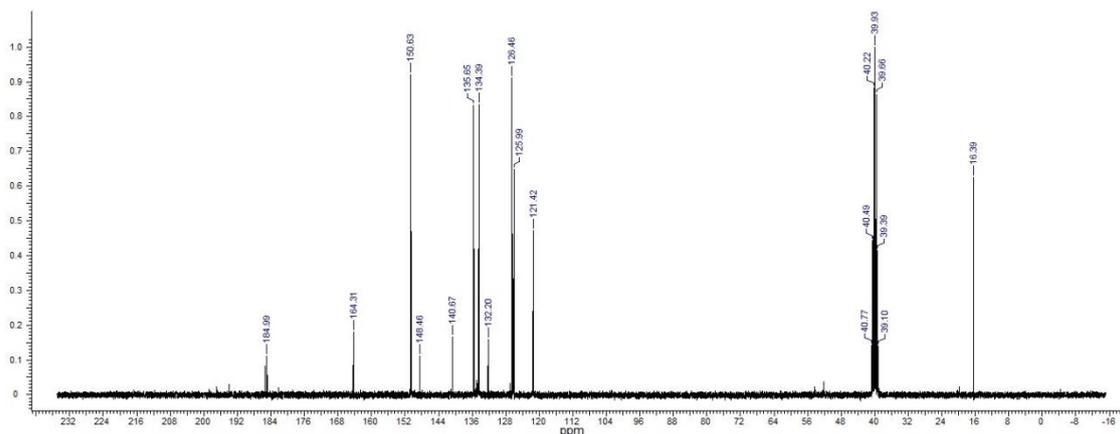


Figura A11. Espectro de ^{13}C RMN do composto K3iz (DMSO, 600 MHz, RT).

APÊNDICE B: Espectros de FT-IR dos complexos e seus respectivos ligantes.

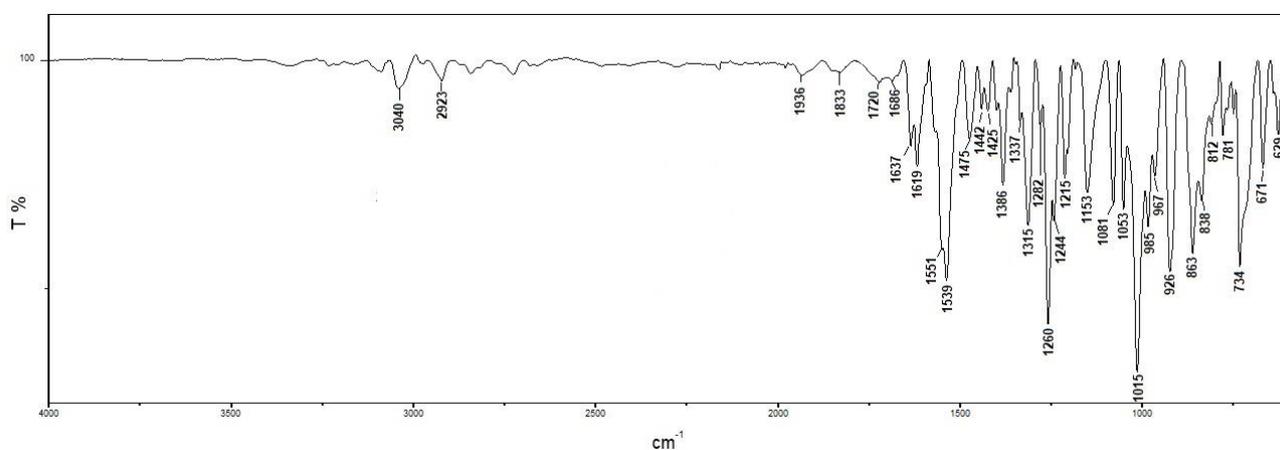


Figura B1. Espectro FT-IR do composto H_2L^1 .

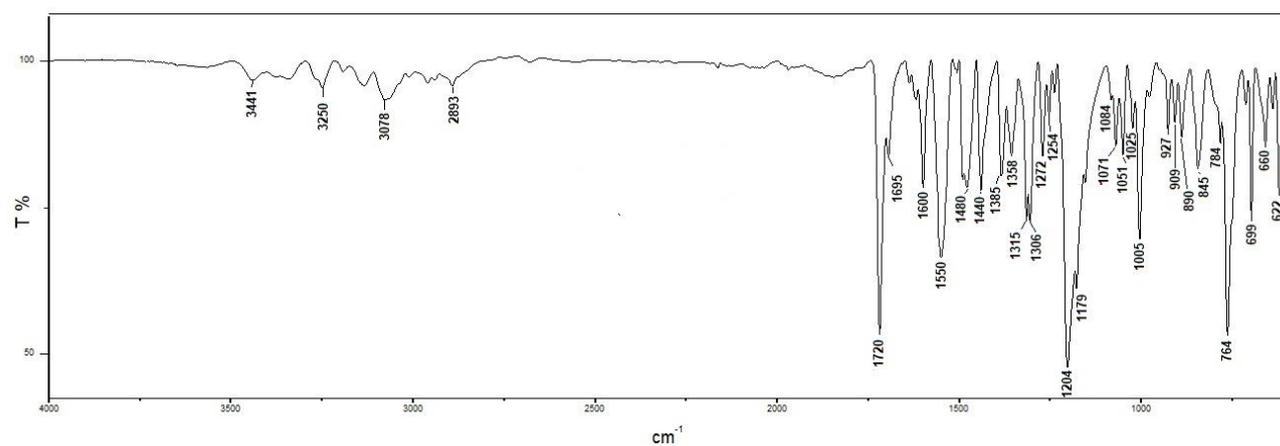


Figura B2. Espectro FT-IR do composto H_2L^2 .

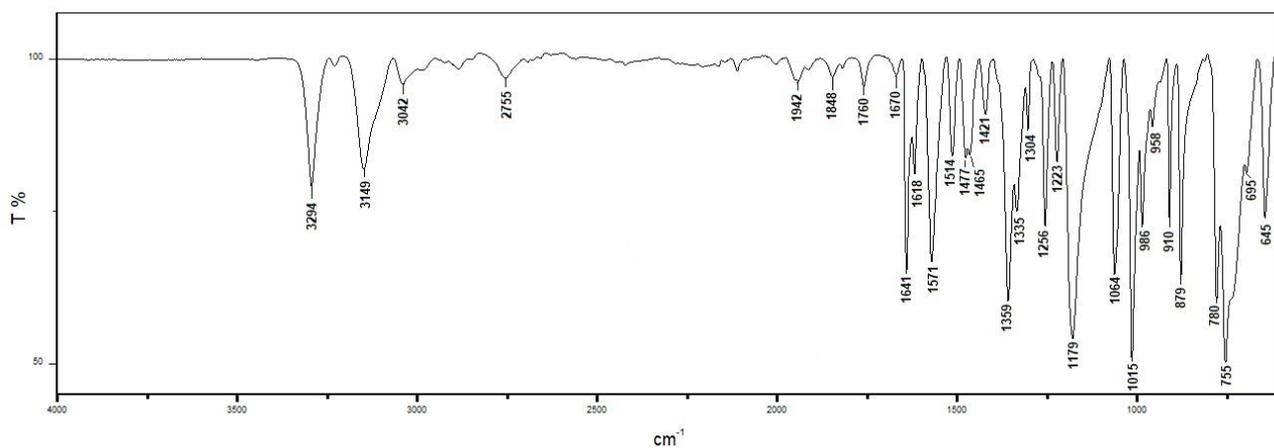


Figura B3. Espectro FT-IR do composto H_2L^3 .

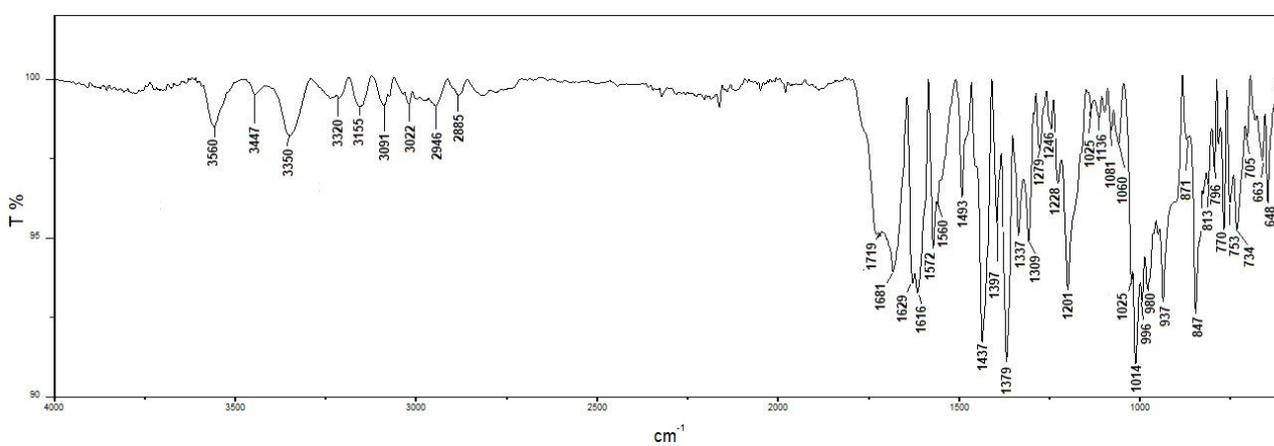


Figura B4. Espectro FT-IR do complexo (1).

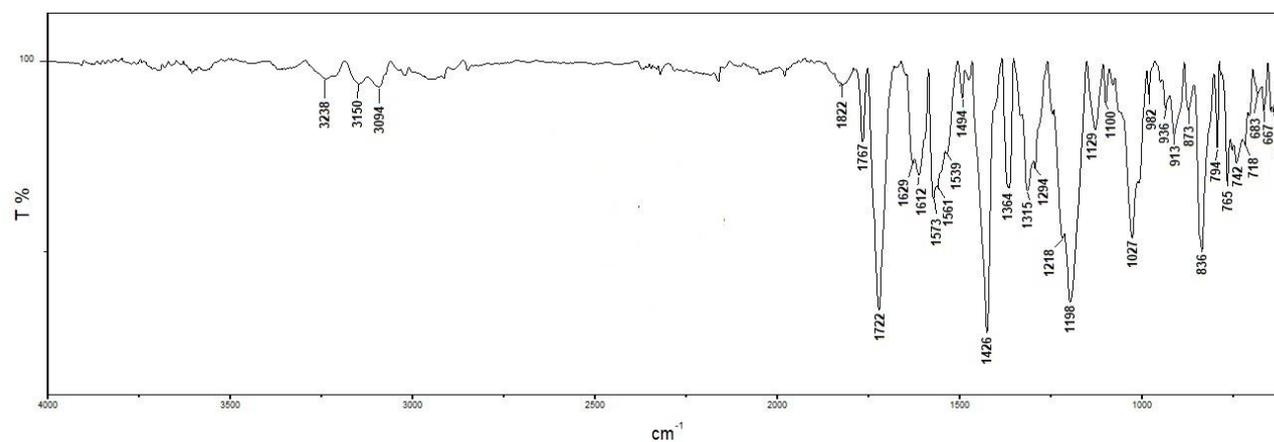


Figura B5. Espectro FT-IR do complexo (2).

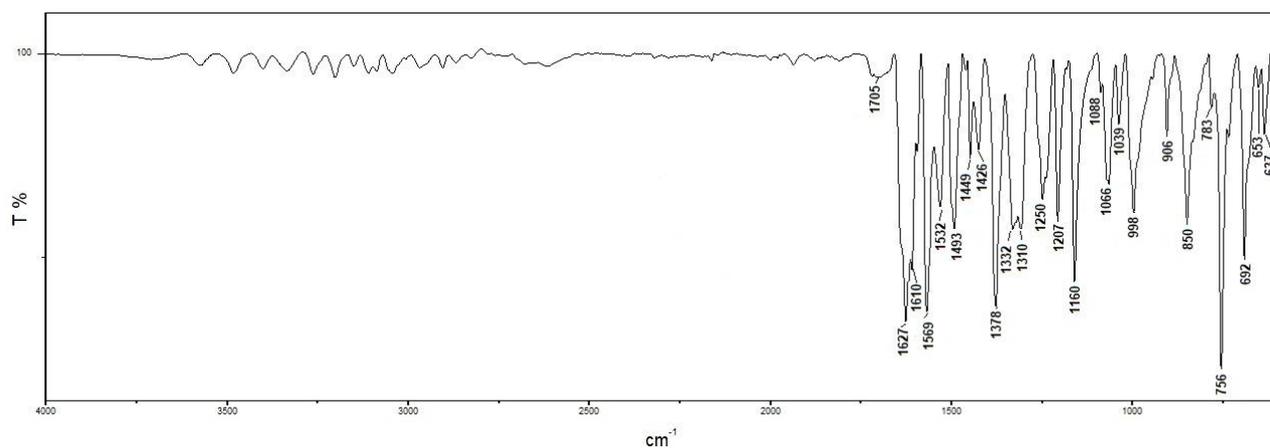


Figura B6. Espectro FT-IR do complexo (3).

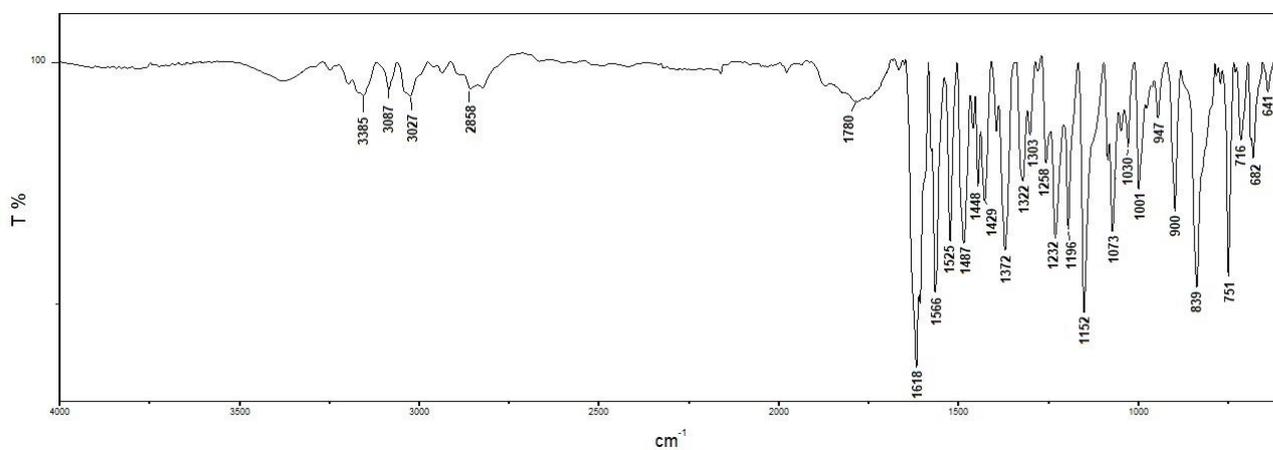


Figura B7. Espectro FT-IR do complexo (4).

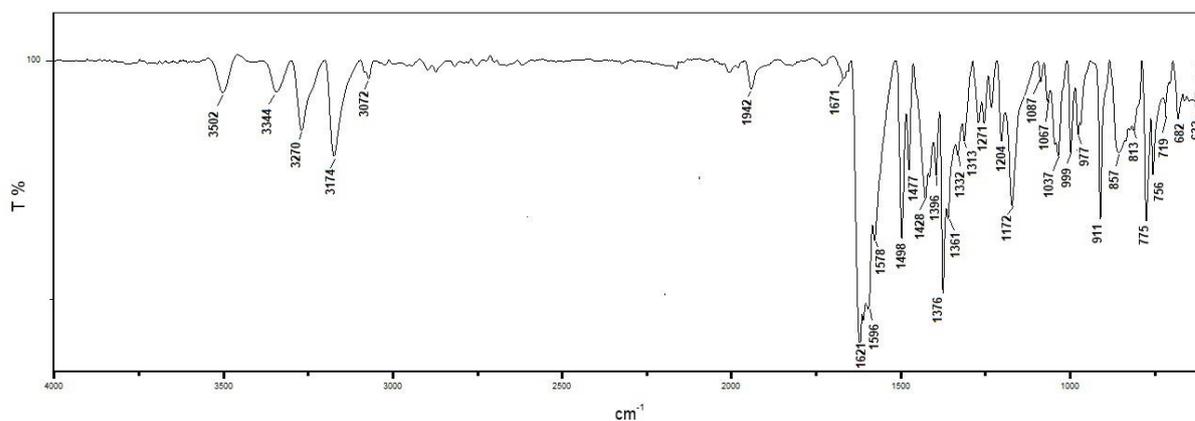


Figura B8. Espectro FT-IR do complexo (5).

APÊNDICE C: Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-VIS dos complexos e seus respectivos ligantes.

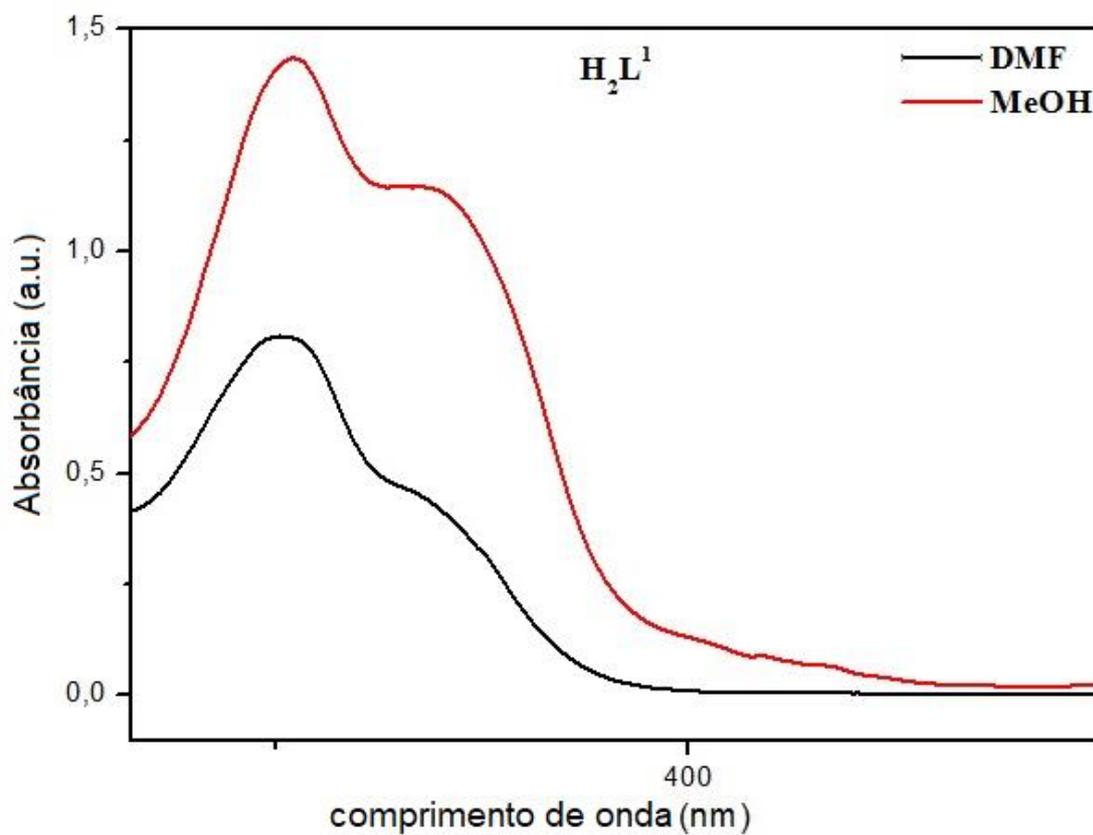


Figura C1. Espectro UV-VIS do composto H_2L^1 .

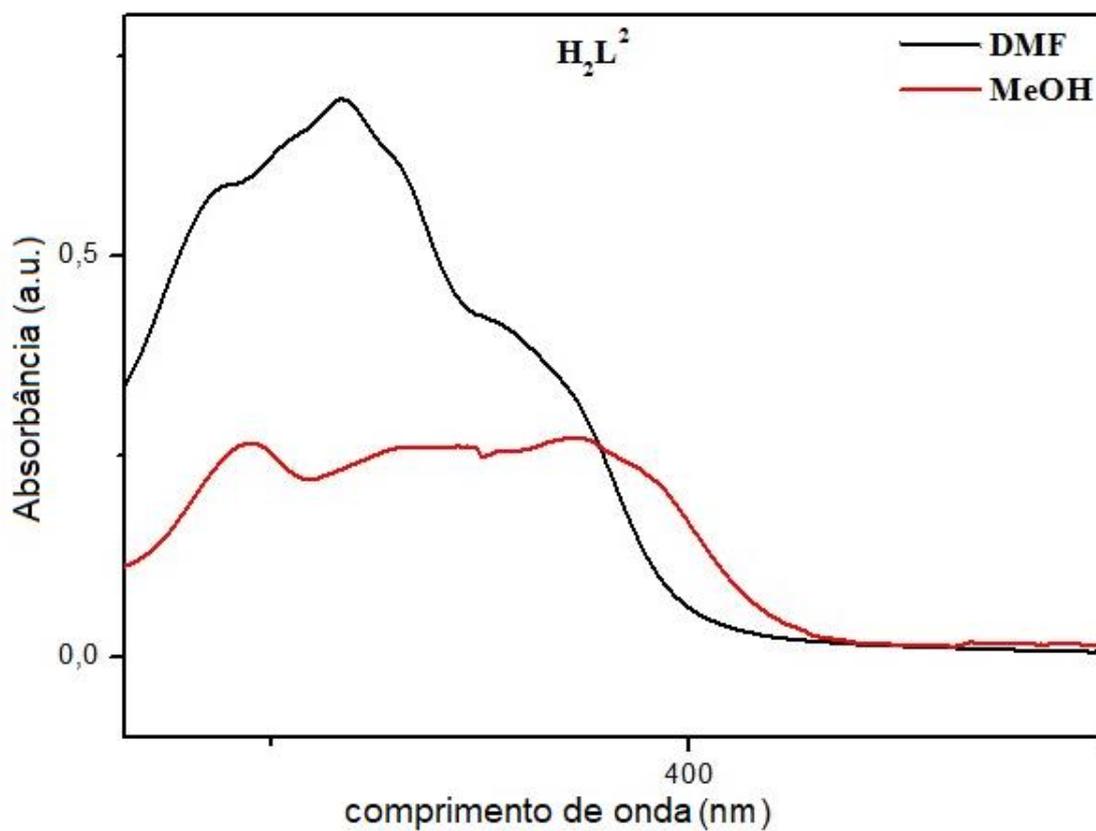


Figura C2. Espectro UV-VIS do composto H_2L^2 .

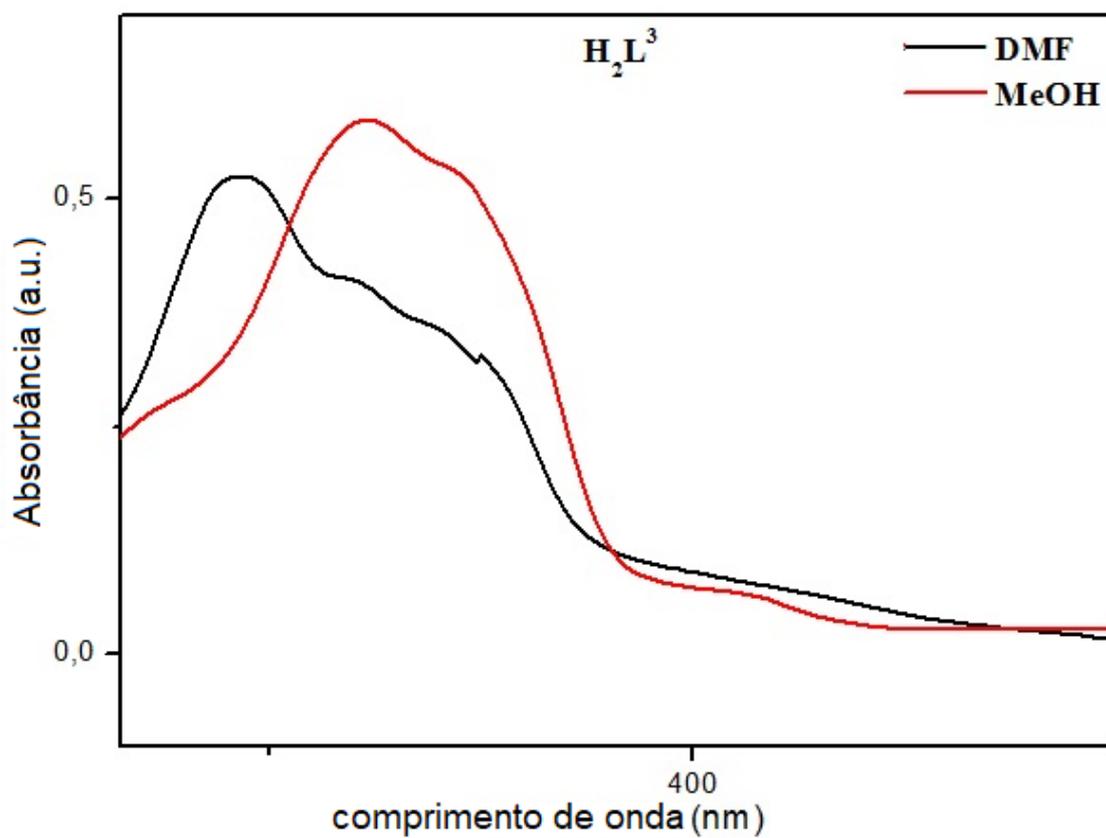


Figura C3. Espectro UV-VIS do composto H_2L^3 .

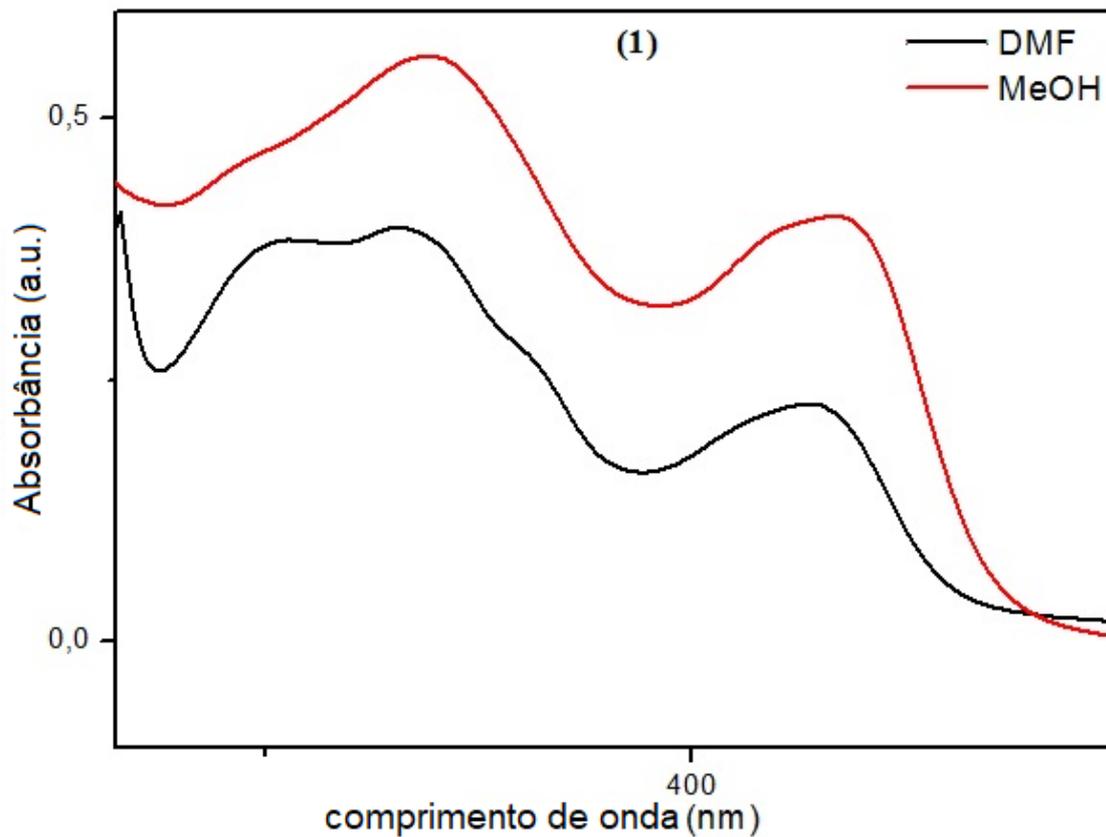


Figura C4. Espectro UV-VIS do complexo (1).

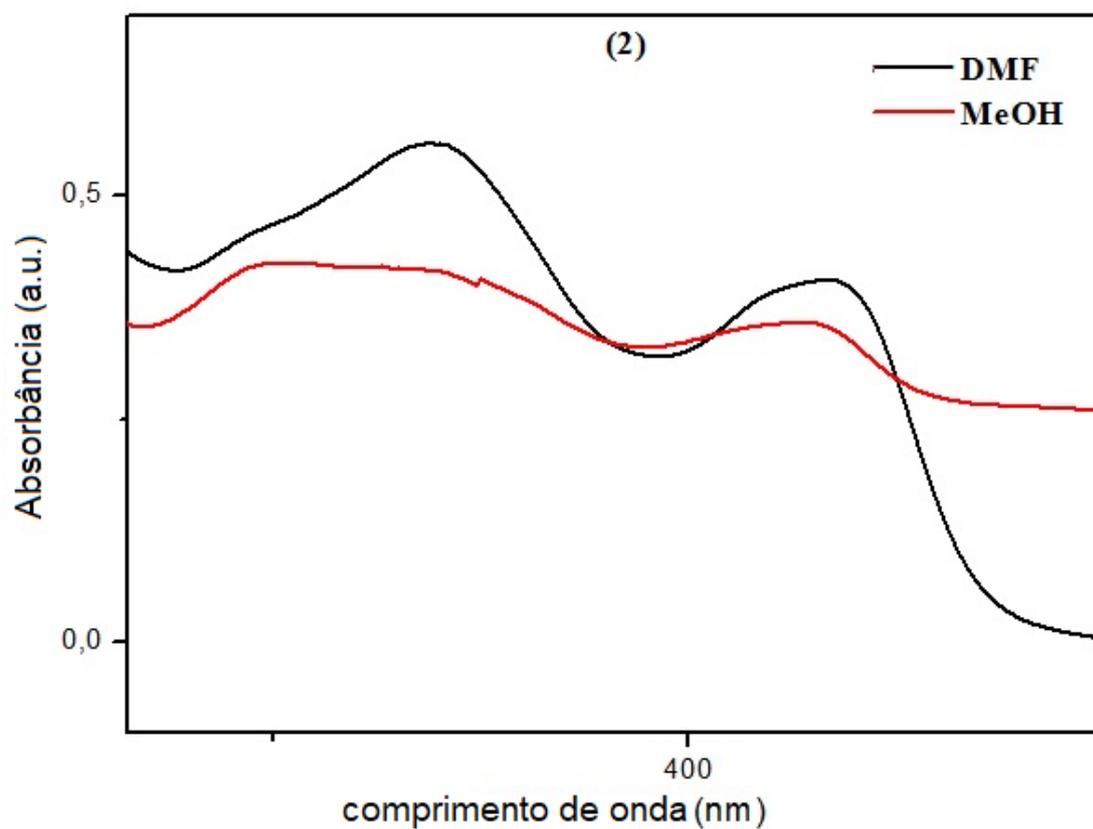


Figura C5. Espectro UV-VIS do complexo (2).

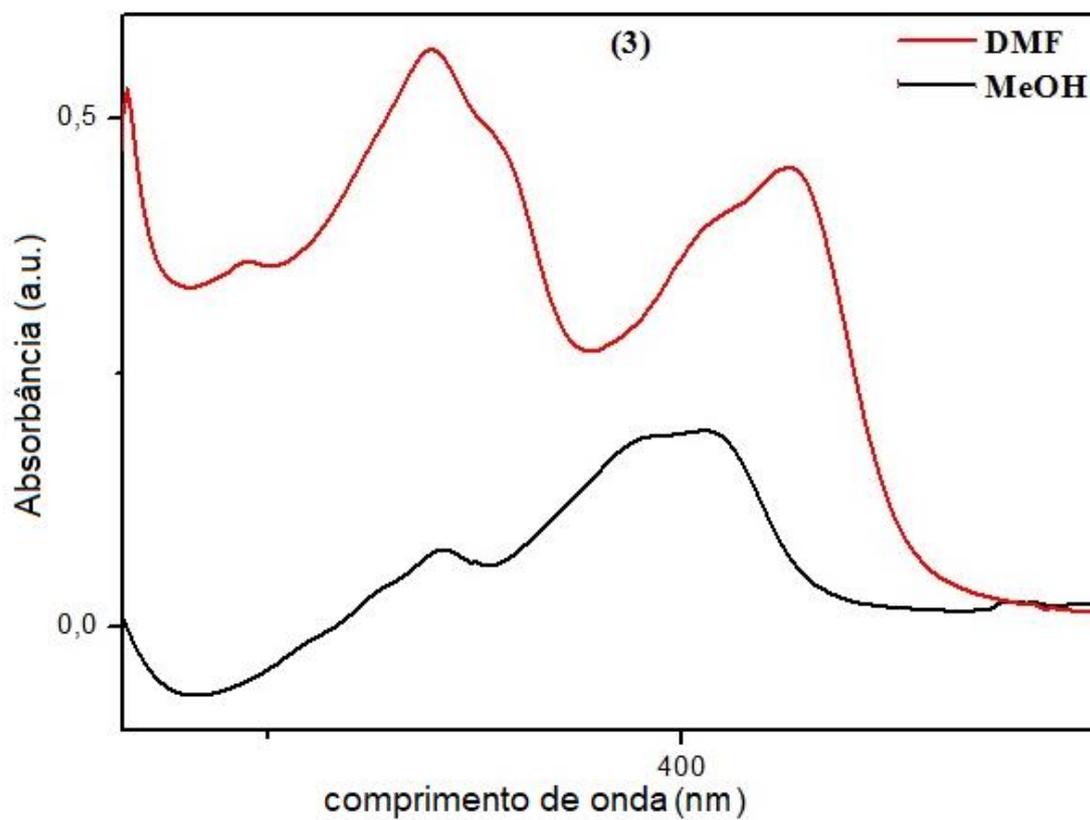


Figura C6. Espectro UV-VIS do complexo (3).

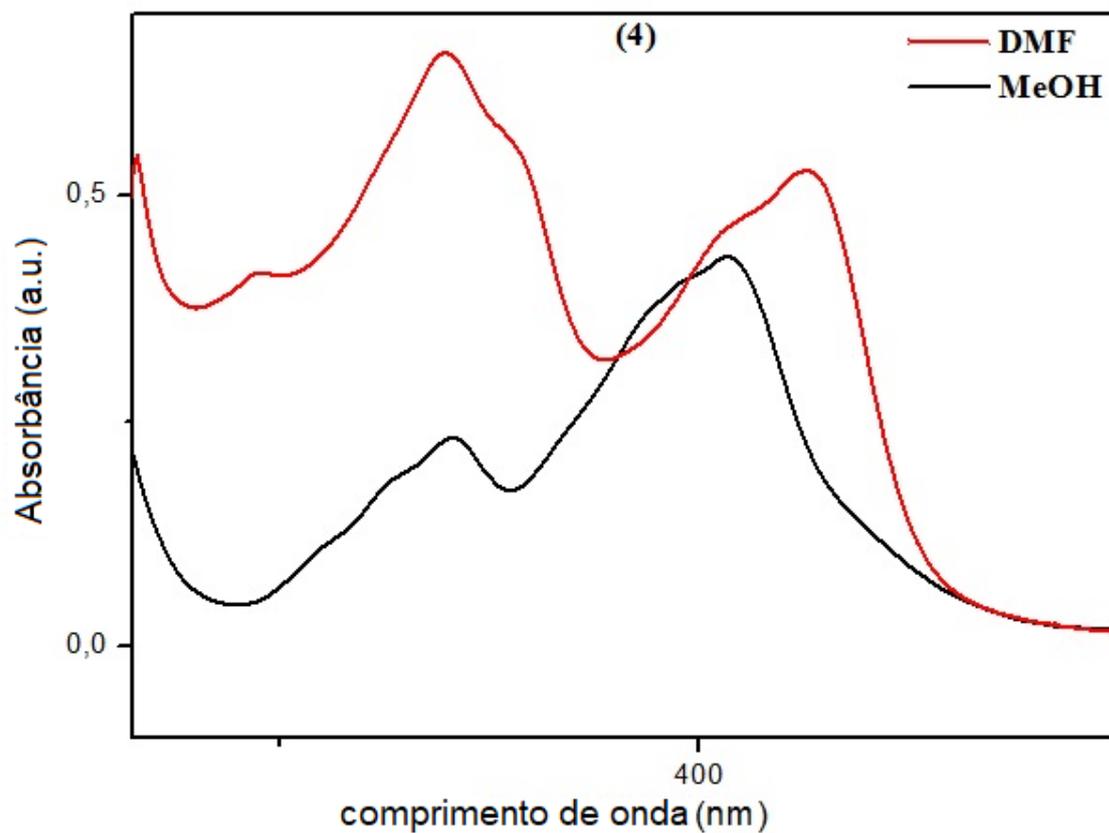


Figura C7. Espectro UV-VIS do complexo (4).

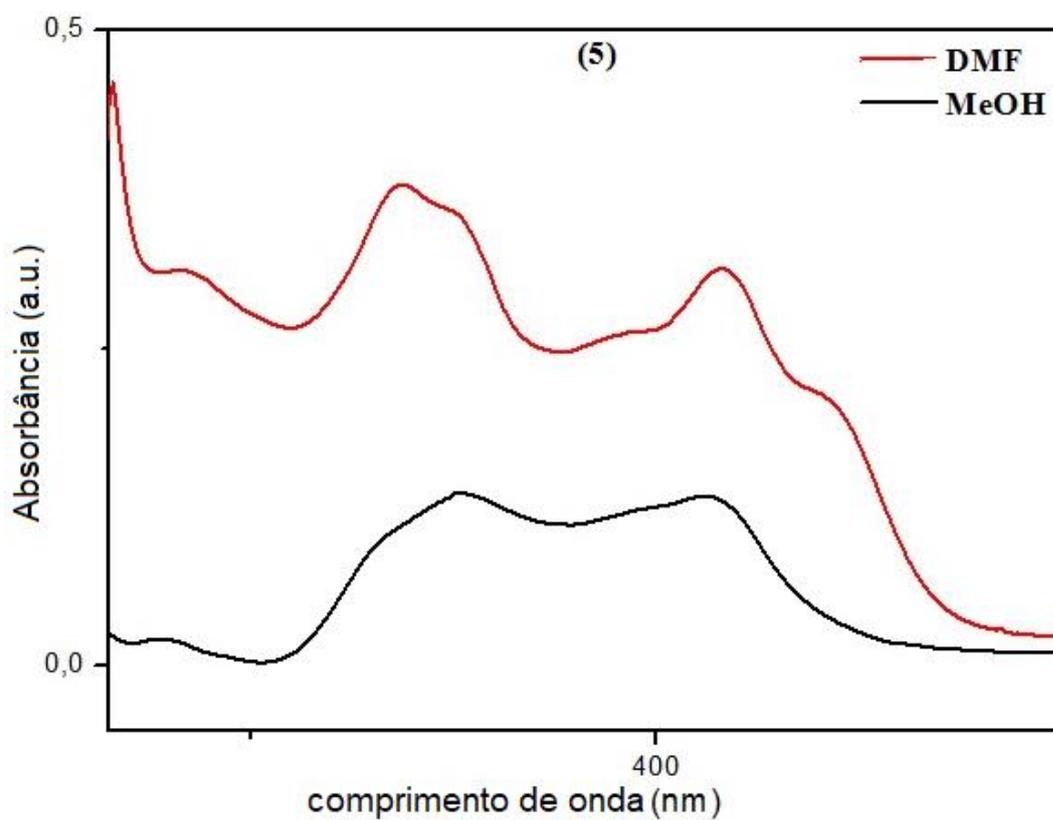


Figura C8. Espectro UV-VIS do complexo (5).

ANEXOS



Copper(II) complexes with pyridoxal dithiocarbazate and thiosemicarbazone ligands: crystal structure, spectroscopic analysis and cytotoxic activity

Claudia C. Gatto¹ · Marcio A. S. Chagas¹ · Iarlane J. Lima¹ · Francielli Mello Andrade² · Hugo D. Silva^{2,3} · Gabrielly R. Abrantes² · Elisângela P. S. Lacerda²

Received: 24 October 2018 / Accepted: 7 December 2018
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

The present study reports the synthesis and crystal structures of Cu(II) complexes with pyridoxal *S*-allyldithiocarbazate (H_2L^1) and pyridoxal thiosemicarbazones (H_2L^2 = pyridoxal-*N*⁴-phenyl-3-thiosemicarbazone and H_2L^3 = pyridoxal-*N*⁴-semicarbazone). The single-crystal X-ray study reveals that in all cases, the Schiff base coordinated tridentately through the *ONS*-donor atoms, resulting in distorted square planar coordination geometries with the copper atoms. The Cu(II) complexes with pyridoxal dithiocarbazate, $[Cu(HL^1)Cl] \cdot H_2O$ and $[Cu(HL^1)Br] \cdot H_2O$, as well as three complexes with pyridoxal thiosemicarbazone, $[Cu(HL^2)Cl] \cdot dmf$, $[Cu(HL^2)Br] \cdot H_2O \cdot dmf$ and $[Cu(H_2L^3)Br]Br \cdot H_2O$, were also characterized by spectroscopic and physical–chemical analyses. The cytotoxicity of the complexes toward two kinds of cancerous cells (Ehrlich and S-180 cells) was evaluated by an MTT assay. The complex $[Cu(H_2L^3)Br]Br \cdot H_2O$ was selected to study both the cellular and molecular mechanisms underlying its promising cytotoxicity. The Hoechst 33342/PI dual-staining assay showed the typical apoptotic morphology of cancer cells, and the RT-qPCR analysis revealed that the expressions of *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* and *TP53* were markedly increased in both the Ehrlich and S-180 cells exposed to 10 μ M for 3 h. According to our results, this complex induces cell death through apoptosis, showing potential as a future drug against cancer.

Introduction

Schiff bases form metal complexes with different geometries and coordination numbers and have been developed to optimize the treatment of various diseases [1–4]. This class of

ligands is characterized by the presence of an imino group ($R_2C=NR'$), has several possible modes of coordination with transition metals and has several biological applications and interesting physicochemical properties [1, 5, 6]. Schiff bases formed with the pyridoxal moiety and their metal complexes have been attracting special attention for many years [7, 8]. Dithiocarbazates and thiosemicarbazones derived from pyridoxal can form complexes with a variety of transition metals through the tridentate coordination of the phenol oxygen, azomethine nitrogen and thiolate sulfur atoms [9, 10]. Both varieties of ligands present high electronic delocalization, especially when aromatic groups are bound to the azomethine carbon. They also have very promising biological applications, and their metal complexes exhibit important biological properties [11, 12].

Dithiocarbazates (DTC) and thiosemicarbazones (TSC) are important multidentate ligands with N and S donor atoms that have been studied over the years due to their pharmacological applications [13, 14]. Furthermore, copper(II) complexes in this class of compounds appear to be very promising candidates for pharmacological applications due to the cytotoxic properties described by a considerable number of

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11243-018-00299-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Claudia C. Gatto
ccgatto@gmail.com

Francielli Mello Andrade
mello.francielli@gmail.com

¹ Laboratory of Inorganic Synthesis and Crystallography, University of Brasília (IQ-UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF CEP 70904-970, Brazil

² Laboratory of Molecular Genetics and Cytogenetics, Federal University of Goiás, Campus Samambaia (Campus II), Goiânia, GO CEP 74690-900, Brazil

³ University Centre of Goiás (Centro Universitário de Goiás - Uni- ANHANGÜERA), Polo Sede, Goiânia, GO CEP 74423-115, Brazil

published papers, showing antifungal, antibacterial and anti-tumor activities [13–18].

In the present paper, we report the synthesis and the crystal structures of five copper(II) complexes with pyridoxal dithiocarbamate or thiosemicarbazone ligands, $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Cl}]\cdot\text{dmf}$ (3), $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{dmf}$ (4) and $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^3)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5) (ligands are shown in Scheme 1). Spectroscopic and physical–chemical analyses, such as FTIR, elemental analysis, molar conductivity and UV–Vis spectroscopy, were used to confirm the structures. The anticancer activities of the compounds were evaluated against sarcoma S-180 and Ehrlich tumor cell lines. The complex determined to have the best IC_{50} values (i.e., the concentration of complex in μM that results in a 50% reduction in cellular viability) for cancer cells was selected to analyze the molecular mechanism of cell death.

Experimental section

Materials, methods and instruments

All reagents and solvents were commercially available. Pyridoxal-*S*-allyldithiocarbamate (H_2L^1), pyridoxal-*N*⁴-phenyl-3-thiosemicarbazone (H_2L^2) and pyridoxal-*N*⁴-semicarbazone (H_2L^3) were prepared as described in related literature by condensation reactions of equivalent amounts of pyridoxal hydrochloride and the corresponding carbazate or thiosemicarbazide [19, 20]. Elemental analysis was obtained with a Perkin Elmer/Series II 2400 analyzer. The molar conductance of a 10^{-3} M solution of each metal complex in MeOH was measured at room temperature (25 °C) using an Ion DDS 12DW microprocessor conductivity meter and a dip-type cell with a platinized electrode. FTIR spectra were obtained in a Perkin Elmer spectrophotometer (model Spectrum 100), operating in the range of $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ with attenuated reflectance (ATR) Fourier transform. ^1H and ^{13}C

NMR spectra of the free ligands were obtained from DMSO-*d*₆ solutions at room temperature on a Bruker Avance III HD 600 MHz spectrometer. The UV–Vis spectra were collected on a Varian Cary 500 recording spectrophotometer over the range of 1000–200 nm.

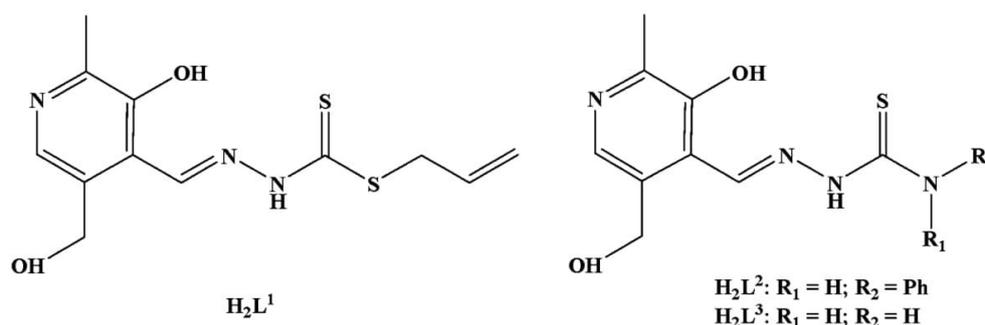
Synthesis of copper(II) complexes 1–5

$[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1)

A solution of pyridoxal-*S*-allyldithiocarbamate (H_2L^1) (30 mg, 0.1 mmol) in MeOH (5 mL) was added to a stirred solution of CuCl_2 (14 mg, 0.1 mmol) in MeOH (5 mL). The mixture was heated under reflux for 3 h. Dark green crystals were obtained directly from the resulting solution at room temperature. Yield: 26 mg (62%). Melting Point: 242 °C. Elemental analysis calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClCuN}_3\text{O}_3\text{S}_2$: C 34.87; H 3.96; N 10.16%; Found: C 34.54; H 3.87; N 10.55%. Molar conductivity (10^{-3} M, MeOH): $83.6\ \Omega^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$. Selected IR bands (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 2657, $\nu(\text{NH}^+)$; 1629, $\nu(\text{C}=\text{N})$; 1247, $\nu(\text{NN})$; 847, $\nu(\text{C}-\text{S})$. UV–Vis (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 224, 338$ and 434 nm ; (DMF): $\lambda_{\text{max}} = 332$ and 422 nm .

$[\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Br}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2)

Pyridoxal-*S*-allyldithiocarbamate (H_2L^1) (30 mg, 0.1 mmol) was dissolved in MeOH (5 mL) and added to a solution of CuBr_2 (23 mg, 0.1 mmol). The mixture was heated under reflux for 3 h. Dark green crystals of (2) were obtained by slow evaporation of the solvent. Yield: 47 mg (87%). Melting Point: 253 °C. Elemental analysis calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{CuN}_3\text{O}_3\text{S}_2$: C 31.48; H 3.52; N 9.18%; Found: C 31.54; H 3.87; N 9.49%. Molar conductivity (10^{-3} M, MeOH): $82.2\ \Omega^{-1}\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$. Selected IR bands (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 2632, $\nu(\text{NH}^+)$; 1620, $\nu(\text{C}=\text{N})$; 1345, $\nu(\text{NN})$; 780, $\nu(\text{C}-\text{S})$. UV–Vis (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 228, 314$ and 423 nm ; (DMF): $\lambda_{\text{max}} = 329$ and 427 nm .



Scheme 1 Pyridoxal dithiocarbamate (left) and thiosemicarbazone (right) in their thione form used throughout the experiments

[Cu(HL²)Cl]·dmf (3)

A solution of pyridoxal-*N*⁴-phenyl-3-thiosemicarbazone (H₂L²) (32 mg, 0.1 mmol) in MeOH (5 mL) was reacted with a solution of CuCl₂ (14 mg, 0.1 mmol) in the same amount of solvent (5 mL). The solution was heated under reflux for 3 h. Brown crystals were obtained after recrystallization from DMF. Yield: 39 mg (79%). Melting Point: 276 °C. Elemental analysis calcd. for C₁₈H₂₂ClCuN₅O₃S: C 44.35; H 4.55; N 14.37%; Found: C 44.27; H 4.82; N 14.46%. Molar conductivity (10⁻³ M, MeOH): 86.8 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Selected IR bands (KBr, ν_{max}/cm⁻¹): 3415, ν(NH-Ph); 2591, ν(NH⁺); 1629, ν(C=N); 1250, ν(NN); 758, ν(C=S). UV-Vis (MeOH): λ_{max} = 262, 336 and 429 nm; (DMF): λ_{max} = 339 and 426 nm.

[Cu(HL²)Br]·H₂O·dmf (4)

The synthesis was similar to the one described for (3); however, the CuCl₂ was changed to CuBr₂ (23 mg, 0.1 mmol) and green crystals were obtained after recrystallization from DMF. Yield: 44 mg (81%). Melting Point: 282 °C. Elemental analysis calcd. for C₁₈H₂₄BrCuN₅O₄S: C 39.31; H 4.40; N 12.73%; Found: C 39.09; H 4.72; N 13.16%. Molar conductivity (10⁻³ M, MeOH): 88.4 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Selected IR bands (KBr, ν_{max}/cm⁻¹): 3396, ν(NH-Ph); 2401, ν(NH⁺); 1625, ν(C=N); 1228, ν(NN); 755, ν(C=S). UV-Vis (MeOH): λ_{max} = 260, 367 and 430 nm; (DMF): λ_{max} = 340 and 426 nm.

[Cu(H₂L³)Br]Br·H₂O (5)

A solution of pyridoxal-*N*⁴-semicarbazone (H₂L³) (24 mg, 0.1 mmol) in MeOH (5 mL) was added to a solution of CuCl₂ (14 mg, 0.1 mmol) in MeOH (5 mL). The mixture was heated under reflux for 3 h. Brown crystals were obtained after some days of slow evaporation. Yield: 38 mg (79%). Melting Point: 231 °C. Elemental analysis calcd. for C₉H₁₄Br₂CuN₅O₄S: C 22.44; H 2.93; N 11.63%; Found: C 22.42; H 2.48, N 11.54%. Molar conductivity (10⁻³ M, MeOH): 186.4 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Selected IR bands (KBr, ν_{max}/cm⁻¹): 3290, ν(NH₂); 2751, ν(NH⁺); 1644, ν(C=N); 1282, ν(NN); 752, ν(C=S). UV-Vis (MeOH): λ_{max} = 241, 337 and 416 nm; (DMF): λ_{max} = 332 and 412 nm.

X-ray crystallographic study

X-ray data collection was accomplished on a Bruker CCD SMART APEX II single-crystal diffractometer with Mo Kα radiation (0.71073 Å). The data were processed with SAINT, and SADABS was used to scale it and perform the multi-scan absorption correction [21]. The structures were solved by direct methods using SHELXS-97 [22], and a subsequent Fourier difference map analysis yielded the

positions of the non-hydrogen atoms. The refinements were performed using SHELXL-2016 [23]. Molecular graphics were generated with the ORTEP [24], POV-Ray and DIAMOND [25] programs. The crystal data, experimental details and refinement results are summarized in Table 1. Crystallographic data for the structural analysis have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre, with reference numbers 1,582,555–1,582,559. The crystallographic data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Biological activity**Cell culture**

Murine Sarcoma-180 tumor cells (S-180) (ATCC[®]# TIB-66) and Murine breast carcinoma Ehrlich tumor (ATCC[®]# CCL77TM) cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco[®], Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®], Life Technologies), 100 μg mL⁻¹ penicillin and 100 μg mL⁻¹ streptomycin. The cultures were incubated in a humidified incubator (Thermo Scientific) at 37 °C with 5% CO₂, according to the methods described by de Lima et al. [26]. Control and treated cells were exposed to a final concentration of 0.1% DMSO (no cytotoxicity).

Cell viability assay (MTT assay)

The cytotoxic effects of the five compounds were evaluated using the MTT assay with Ehrlich and S-180 cells. Initially, 1.0 × 10⁵ of Ehrlich and S-180 cells were placed separately on plaques of a 96-well tissue culture plate and treated with different concentrations of the five complexes (0.2–200 μM) for 48 h. After this treatment, 10 μL of MTT (5 mg mL⁻¹) was added to each well, and the plates were incubated at 37 °C for an additional 3 h. The purple formazan crystals were dissolved in 50 μL of solubilization solution [40% (vol/vol) dimethylformamide (DMF), 2% (vol/vol) glacial acetic acid and 16% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS) at pH = 4.7]. After that, the absorbance was determined at 545 nm using a Stat Fax 2100 microplate reader (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). The cell viability was calculated according to the following equation:

$$V = \left(\frac{\text{Abs}_t}{\text{Abs}_c} \right) \times 100$$

where V, Abs_t and Abs_c are, respectively, the percentage of cell viability (%) obtained from three independent experiments, each done in triplicate, the absorbance of the treated wells and absorbance of the control wells. The determination

Table 1 X-ray structure data collection and refinement parameters for compounds **1–5**

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Empirical formula	C ₁₂ H ₁₆ ClCuN ₃ O ₃ S ₂	C ₁₂ H ₁₆ BrCuN ₃ O ₃ S ₂	C ₁₈ H ₂₂ ClCuN ₃ O ₃ S	C ₁₈ H ₂₄ BrCuN ₃ O ₄ S	C ₉ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ O ₃ S
Formula weight	413.39	457.85	487.45	549.93	481.66
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>C</i> 2/ <i>c</i>	<i>C</i> 2/ <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
<i>a</i> (Å)	6.759(3)	6.790(5)	25.157(13)	24.889(16)	8.235(11)
<i>b</i> (Å)	18.464(8)	18.567(13)	8.438(6)	10.579(7)	21.183(3)
<i>c</i> (Å)	13.319(6)	13.331(10)	20.063(11)	16.991(11)	9.095(13)
β (°)	100.353(2)	100.842(4)	93.178(4)	93.648(3)	113.133(3)
<i>V</i> (Å ³)	1634.96(13)	1650.7(2)	4252.3(4)	4464.7(5)	1458.9(3)
<i>Z</i>	4	4	8	8	4
ρ calcd (Mg·cm ⁻³)	1.679	1.842	1.523	1.636	2.193
μ (mm ⁻¹)	1.768	4.010	1.280	2.896	7.129
Reflections collected	16,509	15,031	18,874	17,720	13,913
Reflections unique/Rint	3613/0.0385	3442/0.0608	4366/0.0795	3923/0.0757	3235/0.0504
Data/restraints/param.	3613/0/206	3442/0/213	4366/0/282	3923/0/280	3235/0/191
Absorption correction	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan
Max/min transmission	0.81/0.59	0.68/0.40	0.93/0.82	0.80/0.59	0.45/0.30
Final R indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0.0785/0.1612	0.0469/0.1131	0.0515/0.1067	0.0748/0.2224	0.0560/0.1615
Goof	1.049	1.032	1.027	1.060	1.052
Largest diff. peak and hole (eÅ ⁻³)	1.321/−0.651	0.530/−0.830	0.518/−0.376	1.394/−1.762	0.950/−2.132

of the half-maximal (50%) inhibitory concentration (IC₅₀) was obtained from dose–response curves using GraphPad Prism 4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The IC₅₀ value obtained from the MTT assay was used as a reference for further testing.

Assessment of apoptosis and necrosis

The cells were treated with complex (5) at concentrations of IC₅₀, comparing with a control group without any treatment. After 24 h, the cells were harvested and washed with PBS to a density of 2×10^5 cells mL⁻¹. The cells were suspended in Hoechst 33342 solution (10 μ g mL⁻¹) and propidium iodide (2.5 μ g mL⁻¹) and were incubated at 37 °C for 10 min in total darkness. The slides were observed using a fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). At least 300 target cells were counted on each slide, and each experiment was done in duplicate. The percentages of apoptotic (early and late apoptosis) and necrotic cells were determined from the total number of cells: (a) viable—blue chromatin with organized structure, (b) early apoptosis—bright blue chromatin that is highly condensed or fragmented, (c) late apoptosis—bright pink chromatin that is highly condensed or fragmented and (d) necrosis—pink chromatin with organized structure [27–29].

Gene expression analysis

Ehrlich and S-180 cells in a concentration of 3×10^6 cells (IC₅₀ concentration) were treated, respectively, with complex (5) for 3 h. Total RNA was extracted using the PureLink[®] RNA Mini Kit (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were measured using a Nano-Drop ND-1000 UV–Vis spectrophotometer (Nanodrop Technology, Wilmington, DE). In addition, RNA (OD 260/280 and OD 260/230 > 1.8) with quantity and quality was monitored using Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and RNA 6000 Nano Kit, following the manufacturer's instructions. Only high-quality RNA (RIN \geq 7) was used for subsequent steps. RNA (2 μ g) was then reverse transcribed into cDNA using the high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, USA) in a total reaction mixture of 20 μ L according to the manufacturer's instructions. A fluorescence real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) system with SYBR Green dye (LGC Biotechnology, UK) by comparative Ct method to the genes *Bax*, *Casp3*, *Casp9*, and *TP53* was performed as reported by Lima et al. [30]. All amplifications were run in triplicate in a StepOnePlus[™] real-time PCR system (Applied Biosystems). The 18S ribosomal RNA (Qiagen - Catalog Number PPM72041A) and ultrapure water were used, respectively, as reference

gene and negative controls in all reactions. The primer sequences are shown in Table S1 (supporting information).

Measurement of caspase activity

Direct measurement of the activity of caspase 3 was performed using the ApoTargetCaspase 3 Protease Assay (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. After treatment with complex (5) at concentrations of IC_{50} values for 24 h, the cells were lysed with chilled cell lysis buffer. The protein concentration was then measured using the BSA protein assay kit (BioRad). An aliquot of the protein extract (200 μ g) was mixed with 50 μ L of 2X reaction buffer supplemented with 10 mM DTT (dithiothreitol) and the substrates of DEVD-pNA (caspase 3). The mixtures were then incubated for 2 h at 37 °C. Subsequently, the formation of p-nitroanilide in the samples was measured using an ELISA microplate reader at 405 nm. The increase in the activities of caspase 3 was determined by comparing the results with the control.

Statistical analysis

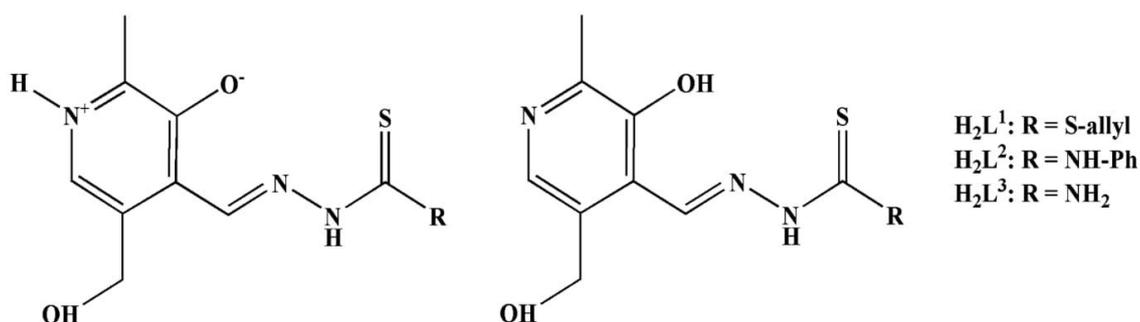
Statistical results were expressed as the mean \pm standard deviation of the means obtained from triplicates of each independent experiment. Graphics were generated with Prism computer software (GraphPad). Correlation tests were performed to determine the effects the concentration of the complex on the tumor cell line. Statistical significance of differences ($p < 0.05$), as compared to untreated cells (control), was evaluated by applying the analysis of variance (ANOVA) and Tukey or Dunnett's post-tests, when applicable, Test T for RT-qPCR and the Mann-Whitney U test for measurement of caspase 3 activity. The IC_{50} (concentration that produces a 50% inhibitory effect on the evaluated parameter) was graphically obtained from the dose-response curves.

Results and discussion

Synthesis and crystal structures analysis

The product of the condensation reaction between pyridoxal (3-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methylpyridine-4-carbaldehyde) with dithiocarbazate or thiosemicarbazide produced the tridentate ligands which are reported in both neutral and ionic forms [31–34]. The pyridoxal moieties can exist in two tautomeric possibilities: zwitterionic oxo with the pyridine nitrogen protonated, and neutral hydroxy forms with the pyridine nitrogen non-protonated (Scheme 2) [11]. In solution and also in the solid state, the zwitterionic form is predominant in the metal complexes with pyridoxal derivatives and this is supported by NMR studies and X-ray analysis [35]. In this work, the Schiff bases in all the copper(II) complexes (1–5) are in zwitterionic form, being coordinated with *ONS*-donor atoms.

In the five copper(II) compounds, the metal centers are coordinated by *ONS*-tridentate ligands, in thiolate tautomeric forms, and the halide ions complete the distorted square-planar geometry. The ligands are connected to the metal center via thiolate sulfur with bond lengths Cu(1)–S(1) between 2.210(2) and 2.256(2) Å, Cu(1)–O(1) of 1.903(5) to 1.931(3) Å and Cu(1)–N(2) of 1.955(3) to 1.974(7) Å. The molecular structure of 1 and 3 show the coordination of the copper(II) atom with chloride ion, and 2, 4 and 5 with bromide ion. The pyridoxal derivatives behave as uninegative zwitterionic ligands in 1–4 (giving neutral complexes) and as a neutral zwitterionic ligand in 5 (giving a cationic complex). The compounds 1 and 2 are isostructural with one water molecule as a solvent in their second coordination sphere. The compounds 3, 4 and [CuCl(pyridoxal N^4 -phenylthiosemicarbazone)], reported by Subarkhan et al. [36], are also isostructural but have a dimethylformamide molecule solvent their the second coordination sphere; however, the difference between 3



Scheme 2 Zwitterionic (left) and neutral tautomeric (right) forms to the pyridoxal derivatives ligands

and the reported compound is an additional water solvent molecule.

For all complexes, the ligands based on dithiocarbamate (Fig. 1) or thiosemicarbazone (Figs. 2, 3) and pyridoxal moieties (forms found in vitamin B6) adopt an *E*

configuration with respect to the C(8)=N(2) and N(3)=C(9) bonds, respectively [37]. A delocalization of electron density in the S–C=N–N=C chain is observed with discrepancy between double and single bonds lengths, indicated by the C(9)–N(3) bond lengths about 1.293(6) and 1.337(9) Å and

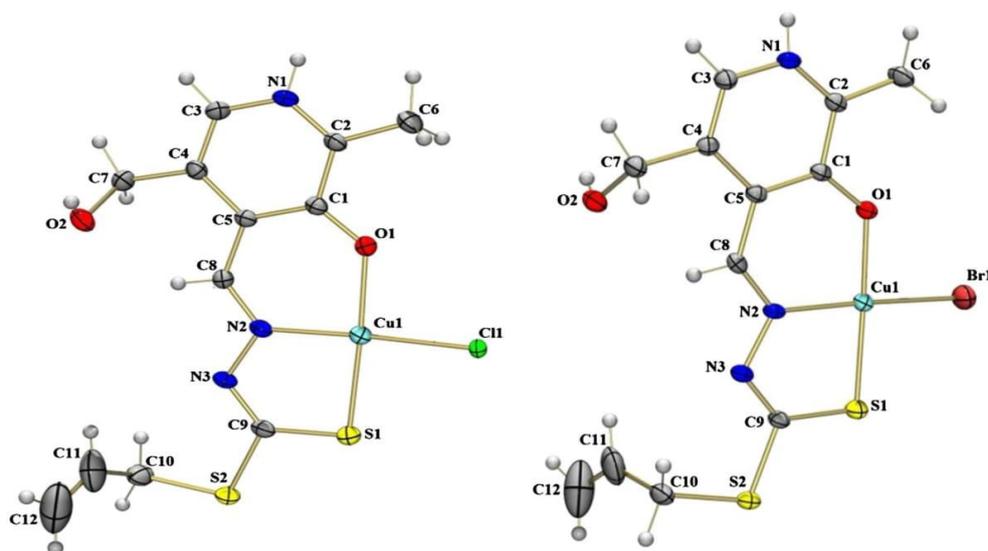


Fig. 1 Molecular structure of Cu(II) complexes 1 and 2 with crystallographic labeling (30% probability displacement ellipsoids)

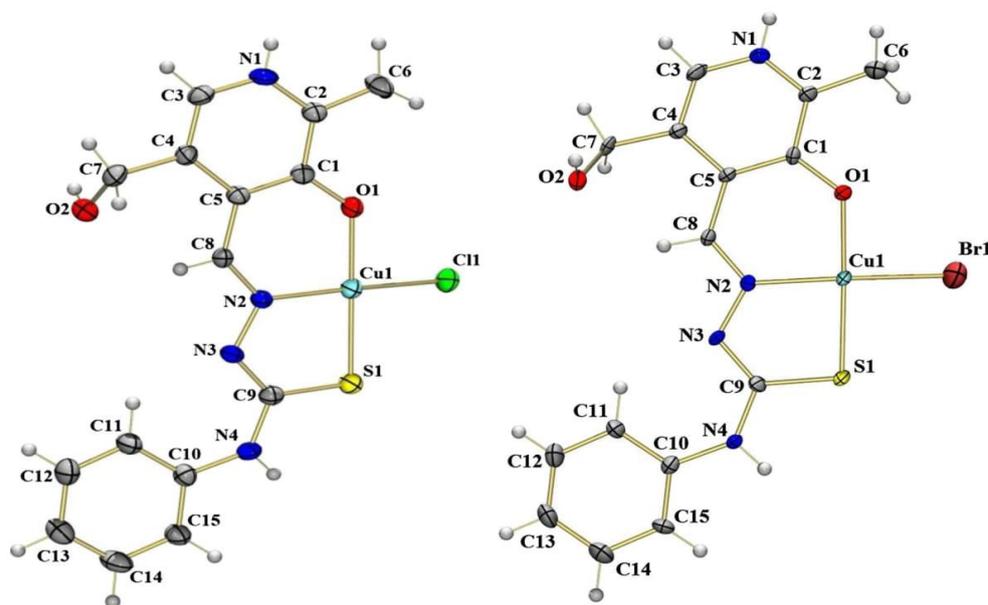


Fig. 2 Molecular structure of Cu(II) complexes 3 and 4 with crystallographic labeling (30% probability displacement ellipsoids)

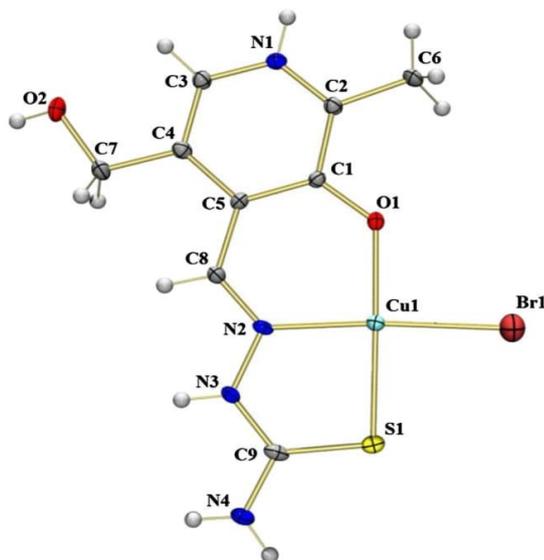


Fig. 3 Molecular structure of **5** with crystallographic labeling (30% probability displacement ellipsoids)

thiolate form with C(9)–S(1) bond lengths around 1.688(8) and 1.738(8) Å. The distortion in the coordination polyhedron of the metal center may be associated with the rigidity of the dithiocarbamate or thiosemicarbazone, with the trans angles of O(1)–Cu(1)–S(1) and N(2)–Cu(1)–X (X=Cl or Br) that are close to the expected 180°. The Cu–Cl and

Cu–Br distances are approximately 2.28 and 2.35 Å, respectively, which is typical for these bonds. This distortion is also reported in square-planar copper(II) complexes with similar ligands [18, 38]. Selected bond lengths and angles are given in Table 2.

The crystal packing revealed by single-crystal X-ray diffraction analysis showed that all the copper compounds are stabilized by intra- and intermolecular hydrogen bonding (Table S1 in Supporting Information). In compound **5**, as shown in Fig. 4, a network is formed connecting the cation complex, the bromide ion and the water solvent molecule. Interestingly, the intra- and intermolecular hydrogen bonding connected the Br(2) with two cation complexes, showing Br(2)···O(2) with distance of 3.199(6) Å and Br(2)···N(1)ⁱ of 3.216(6) Å (*i*: 2–*x*, 1–*y*, 2–*z*). These interactions are important for the crystallization of the compound and in the formation of a supramolecular structure.

Spectroscopic analysis

In the IR spectra of all of the complexes, the absorptions bands of the solvent water molecules were observed at around 3400 cm⁻¹. The tridentate Schiff bases (H₂L¹, H₂L² and H₂L³) can undergo thione-thiolate tautomerization. The IR spectra of the proligands exhibit the thione form with bands of $\nu(\text{C}=\text{S})$ in the range of 879–845 cm⁻¹. In the IR spectra of the copper(II) complexes **1–5**, we observed bands in the region of 839–813 cm⁻¹ of $\nu(\text{C}=\text{S})$, indicating a thiolate form in the solid state. In the metal complexes, the $\nu(\text{C}=\text{N})$ are observed at 1780–1705 cm⁻¹ and

Table 2 Selected bond distances (Å) and bond angles (°) for complexes **1–5**

	1	2	3	4	5
Cu(1)–O(1)	1.931(3)	1.914(3)	1.907(3)	1.910(6)	1.903(5)
Cu(1)–N(2)	1.969(4)	1.964(4)	1.955(3)	1.974(7)	1.966(6)
Cu(1)–S(1)	2.240(14)	2.232(15)	2.215(13)	2.210(2)	2.256(2)
Cu(1)–Cl(1)	2.2832(12)	–	2.275(12)	–	–
Cu(1)–Br(1)	–	2.360(9)	–	2.364(16)	2.363(13)
S(1)–C(9)	1.721(5)	1.730(5)	1.735(4)	1.738(8)	1.688(8)
O(1)–C(1)	1.275(6)	1.295(6)	1.307(4)	1.320(10)	1.300(8)
N(2)–N(3)	1.404(5)	1.403(5)	1.382(4)	1.367(9)	1.370(7)
C(8)–N(2)	1.299(6)	1.291(6)	1.290(5)	1.300(10)	1.285(9)
S(2)–C(9)	1.745(5)	–	–	–	–
O(1)–Cu(1)–S(1)	175.97(11)	176.33(11)	174.41(10)	169.70(2)	170.12(17)
N(2)–Cu(1)–Cl(1)	176.57(12)	–	172.80(10)	–	–
N(2)–Cu(1)–Br(1)	–	176.37(12)	–	170.70(2)	174.65(17)
O(1)–Cu(1)–N(2)	90.93(15)	91.47(15)	92.61(12)	91.80(3)	92.3(2)
N(2)–Cu(1)–S(1)	85.67(12)	85.53(12)	85.16(10)	85.70(2)	86.13(16)
O(1)–Cu(1)–Cl(1)	91.58(10)	–	90.89(9)	–	–
O(1)–Cu(1)–Br(1)	–	91.51(10)	–	91.33(18)	92.06(14)
S(1)–Cu(1)–Cl(1)	91.90(5)	–	91.91(5)	–	–
S(1)–Cu(1)–Br(1)	–	91.57(4)	–	92.69(8)	89.08(6)

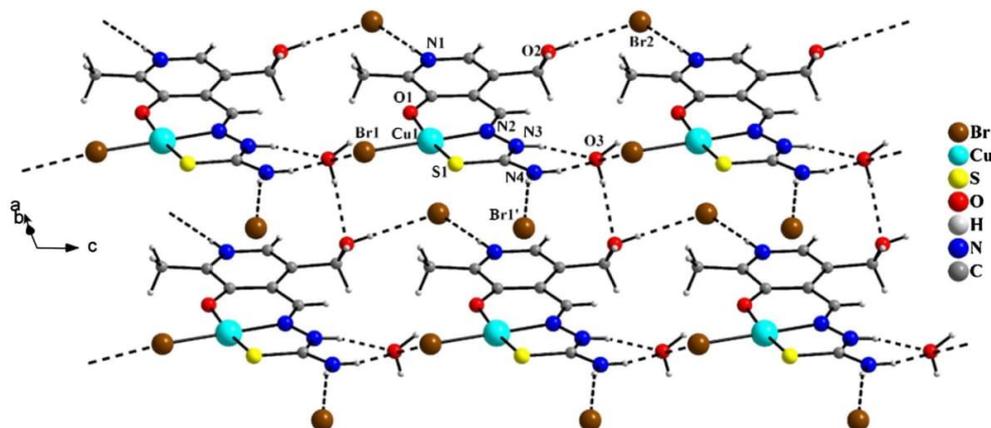


Fig. 4 Hydrogen-bonding network of **5** with hydrogen bonds indicated by dashed lines

1569–1573 cm^{-1} and in the free ligands, between 1760–1720 and 1571–1539 cm^{-1} , evidencing the coordination of the azomethine nitrogen atoms with the copper atoms [39]. The bands observed at around 2890–2755 cm^{-1} are assigned to $\nu(\text{N-H}^+_{\text{py}})$, the protonated nitrogen of the pyridine ring. In all compounds, the IR spectra exhibit the $\nu(\text{N-N})$ in the range of 1260–1201 cm^{-1} , in which the displacements of characteristic bands of the ligands occurred in relation with their complexes. The stretching frequency of $\nu(\text{CSS})$ in the free ligands (at around 1015–937 cm^{-1}) decreased in the complexes (at 847–840 cm^{-1}), indicating the complexation through the thiolate sulfur atom [40].

The ^1H NMR spectra of the Schiff bases were recorded in DMSO-d_6 . The well-defined singlets at $\nu=9.47$ ppm, $\nu=9.47$ ppm and $\nu=9.02$ ppm attributable to the $-\text{NH}$ protons in H_2L^1 , H_2L^2 and H_2L^3 , respectively, indicated that the free ligand remained in the thione form even in solution. We observed the presence of the OH group from vitamin B6 in the Schiff bases, with chemical shifts characteristic for this group singlet between $\nu=8.41$ and 8.82 ppm. In the ^{13}C NMR spectrum of H_2L^1 , the chemical shift is observed at $\nu=36.24$ ppm referring to the $-\text{S}-\text{CH}_2$ group, indicating the characteristic dithiocarbazate formation.

The UV–Vis spectra were recorded in two different solvents (methanol and *N,N*-dimethylformamide) at room temperature for the pyridoxal derivatives and their copper complexes (Figure S15 and Table S4 in Supporting Information). The spectra of the free ligands show absorption bands assigned to $\pi-\pi^*$ and $n-\pi^*$ transitions in the range of 234–332 nm with large values of molar extinction coefficients (log ϵ values between 5.16 and 4.66). In the spectra of the complexes, the absorption bands are displaced to lower wavelengths, indicating coordination of the copper(II) atoms to the ligands. The appearance of the ligand-to-metal charge

transfer (LMCT) transition in the region of 412–434 nm also indicated the coordination of the metal to the Schiff bases. The $\text{S}\rightarrow\text{Cu}^{\text{II}}$ LMCT transition was assigned to a band around 420 nm in the copper(II) complexes with similar values reported in the literature [40]. This strong band is another evidence of the coordination of the metal to the ligands by the thiolate sulfur atom. The electronic spectra of the copper(II) complexes exhibit a d–d band at around 625–750 nm with low values of molar extinction.

The molar conductivities for the **1–4** complexes are between 82.2 and 88.4 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ indicating them to be non-electrolytes. However, it is clearly observed that complex **5** is an electrolyte, with molar conductivity of 186.4 $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, due to the halogen ion and cationic complex [41].

Biological activity

In vitro cytotoxic activity using MTT assays

In vitro cytotoxic activity studies of the complexes using MTT assays revealed that the complex **5** inhibited the tumor growth of Sarcoma-180 and Ehrlich cell lines in a dose-dependent manner. The complex **5** showed significant cytotoxicity compared with doxorubicin, with an IC_{50} value of 33.30 (± 0.06) μM against an IC_{50} value 89.18 (± 2.30) μM in S-180 cells. The same can be observed in the Ehrlich cell line, with an IC_{50} value of 16.89 (± 1.02) μM comparing with an IC_{50} value of 143.80 (± 12.70) for doxorubicin (Table 3). Figure 5 shows the cell viability plots for Sarcoma-180 and Ehrlich cell lines of the compounds **1–5** and also the IC_{50} values for each cell line. Compounds **1** and **4** presented higher values of IC_{50} against tumor lineages, showing less antitumor activity than compound **5**, indicating

Table 3 Cytotoxic activity of doxorubicin (the reference drug), the free ligands and copper(II) complexes **1–5** expressed as the inhibition concentration that causes a 50% decrease in cell growth (IC_{50}), in $\mu\text{mol L}^{-1}$ (95% CI), treated for 48 h at concentrations in the range from 0.2 to 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ against cancer cell line (mean \pm standard error of the mean)

Compound	S-180	EHRlich
H_2L^1	25.3 (± 3.52)	*
H_2L^2	*	*
H_2L^3	*	*
(1)	37.49 (± 2.30)	55.90 (± 2.20)
(2)	25.20 (± 1.46)	*
(3)	53.40 (± 1.80)	*
(4)	36.69 (± 0.73)	89.85 (± 1.44)
(5)	33.30 (± 0.06)	16.89 (± 1.02)
Doxorubicin	89.18 (± 2.30)	143.8 (± 12.70)

Mean \pm SD standard error of at least three independent experiments.
* IC_{50} not calculated

that lower concentrations of this compound are required to inhibit cancer cells growth. It was not possible to determine the IC_{50} for the Ehrlich cell line of the complexes **2** and **3**, and therefore, complex **5** was selected for the following assays.

We observed only IC_{50} values determined for the H_2L^1 ligand to S-180 cells and the copper(II) complexes with this

ligand did not increase the effectiveness against this cell line; however, the compound **1** exhibits reasonable cytotoxicity against Ehrlich cells. The cytotoxic activity of the compounds can be attributed to the properties of the ligands; however, it is observed that the complexes **2–5** present cytotoxicity and effects for the free ligands are not detected. In general, the complexation of the ligands with metal atoms enhances the cytotoxicity with superior activity of the complexes than the free ligands [42, 43]. Reported studies indicated that the efficiency of metal complexes in relation to free ligands is due to better interaction with the cells due to the significant change in several physical–chemical properties of the complexes, such as molecular weight, geometry and redox properties [44, 45].

Confirmation of apoptosis induction by double staining with Hoechst 33342 and propidium iodide

Hoechst 33342/PI double staining allowed apoptotic cells to be distinguished from necrotic cells by morphological changes in Sarcoma-180 and Ehrlich cells treated with complex **5** (Fig. 6). It was verified that cells with highly condensed and bright blue fragmented chromatin, which are in a phase of recent apoptosis, are more abundant compared with cells with highly condensed and fragmented chromatin pink or red, that are in late apoptosis, which represent the low rate of necrosis of cells [46]. According to the observed

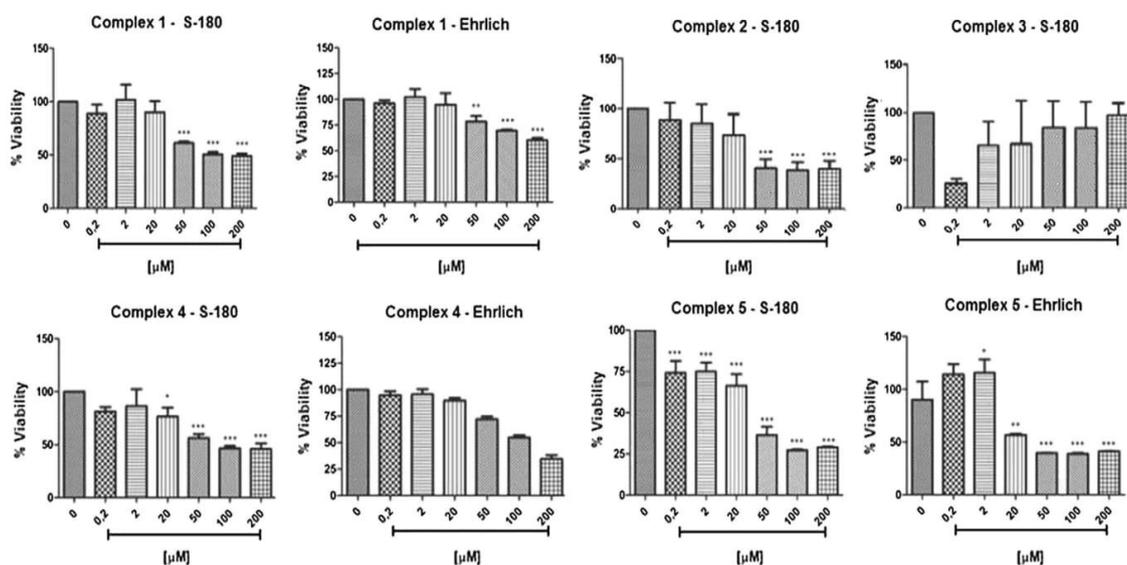


Fig. 5 Effect of the complexes **1–5** on the viability of Murine S-180 and Ehrlich cells treated with different concentrations (0.2–200 μM) and after 48 h of treatment cell viability was assessed by colorimetric assay MTT. The data represent a mean of three independent

experiments \pm SD. Asterisks (*) represent statistically significant cell viability decrease when compared with unstimulated cells (UNS) by one-way ANOVA test. Statistical significance is indicated by asterisks representing p-values (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

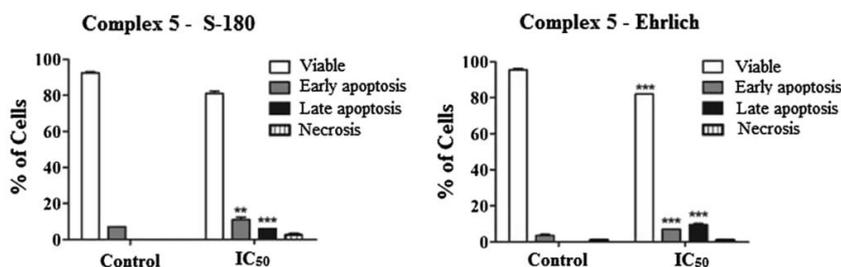


Fig. 6 Percentage of complex **5** in S-180 and Ehrlich cells in apoptosis and necrosis after treatment of bearing mice by double staining with HO/PI. Data show the mean \pm SD of four animals per treatment.

Statistical significance differences with the untreated control are indicated by asterisks representing p-values (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

values, it can be affirmed that in the morphological findings compound **5** induces apoptosis in Murine breast Carcinoma Ehrlich and in sarcoma S-180 tumor. In sarcoma-180 cells, the complex induces a greater proportion of early apoptosis than late apoptosis, and the opposite can be observed in Ehrlich cell line (Fig. 7). It is also identified that the low level of necrosis of the compound can be related to the pathway of cell mortality; therefore, the main route would be apoptotic ($p > 0.001$). Studies show that compounds with similar characteristics may also induce this pathway [16].

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

Figure 8 shows *caspase 3*, *caspase 8*, *caspase 9*, *Bax* and *TP53* transcript expressions analyzed by RT-qPCR in S180 and Ehrlich cells treated with the concentration of 10 μ M of complex **5** for 3 h. It is evident that all analyzed genes showed a very high level of expression in both cell lines treated with complex **5** in comparison with our control (without treatment). The expression of these genes induced apoptosis-related events, because the overexpression is directly involved in the process of cellular death. Although sarcoma-180 cell line showed a higher level of gene expression, except for *Bax* and *TP53*, the gene expression for both cell lines showed the same parameters. In Sarcoma-180, the *TP53* gene expression was increased in comparison with the Ehrlich line and the opposite occurred with the *Bax*—a greater expression in sarcoma-180 than Ehrlich cell line. Either the intrinsic or the extrinsic pathway may initiate apoptosis [47], the extrinsic pathway can crosstalk to the intrinsic pathway through the caspase 8-mediated cleavage of the BID. The data can be comprised by expression of caspase 8 (3 h) gene increasing (maximum expression) 12.90- and 6.30-fold, compared to that in untreated sarcoma-180 and Ehrlich cells lines, respectively.

In several studies with copper(II) complexes, it has been shown that the formation of adducts interacting with DNA in proportion to the concentration administered is widely involved in the mechanism of action of cytotoxicity of this

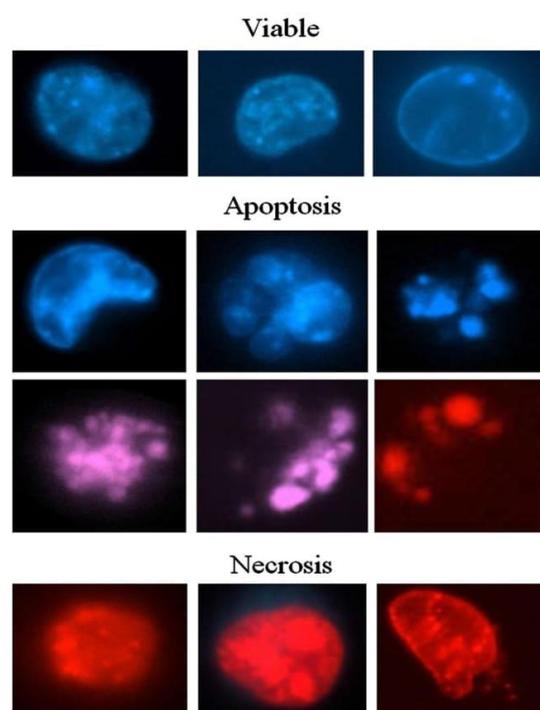


Fig. 7 Representative images show morphological changes of S-180 and Ehrlich cells detected with dual staining of Hoechst 33342/PI: viable (blue chromatin with organized structure), necrosis (red chromatin with organized structure), early apoptosis (bright blue chromatin highly condensed or fragmented), and late apoptosis (pink or red chromatin highly condensed or fragmented of the complex **5**). (Color figure online)

class of metal compounds [48]. The higher level of all caspases indicates that apoptosis actually occurs along with the other results.

The increase in *TP53* levels promoted by *Bax* has been widely documented as the mitochondrial (intrinsic) pathway kind of inducing apoptosis [49], and the presence of

Fig. 8 Effects of the complex **5** on mRNA expression in S-180 and Ehrlich cells

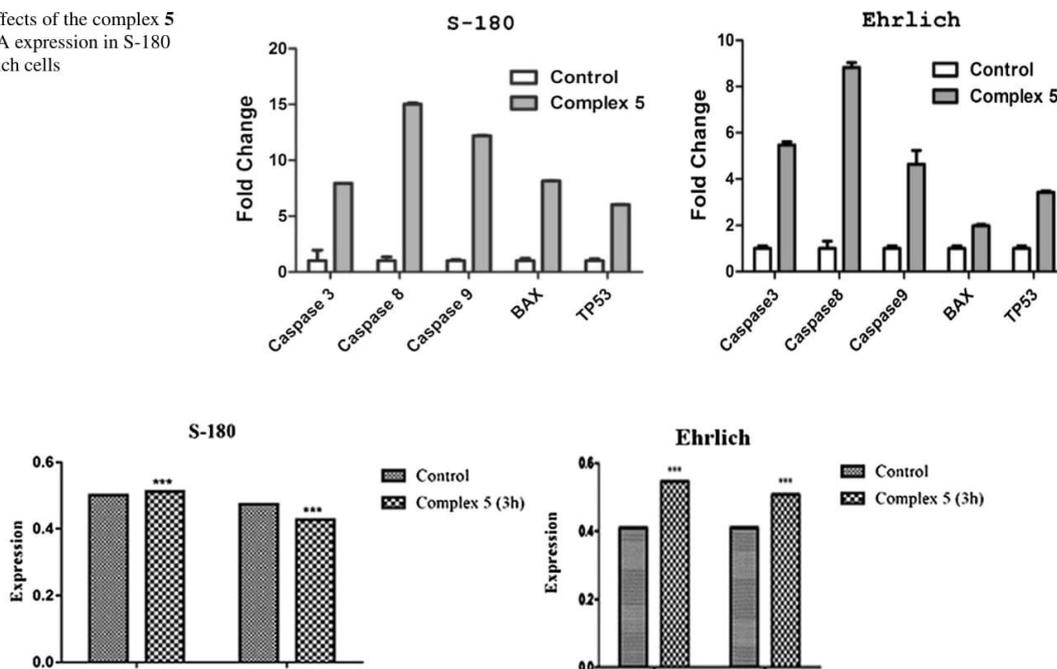


Fig. 9 Proteolytic activities caspase 3 of the complex **5** in the S-180 and Ehrlich cells

the cleaved and activated caspase 3 (Fig. 9) supports our data. The caspase 3 activation is an early event and initiates apoptotic damage causing extensive DNA condensation, shrinkage and fragmentation, and its protein interacts with caspase 8 and caspase 9 [50]. It can be observed in the S-180 cells, which showed a higher amount of early apoptosis than Ehrlich cells, that the number of cells in late apoptosis was higher. These results lead us to conclude that the mechanism of death cell triggered by the complex in S-180 and Ehrlich cell lines is probably an intrinsic apoptosis, but we cannot exclude the participation of other cell death mechanisms or the extrinsic pathway.

Conclusions

In this paper, we have described five potential anticancer copper(II) complexes derived from pyridoxal-S-allyldithiocarbamate and pyridoxal-thiosemicarbazone, in which the structures have particular characteristics in relation to each of their chemical properties, highlighting the methods of synthesis and crystallization. The cytotoxic tests revealed that the copper(II) complexes are capable of inhibiting both S-180 and Ehrlich tumor cells growth. According to the tests performed with compound **5**, it was possible to observe the death pathway of the cells being treated, confirming the

death of the tumor cells by apoptosis. These promising results for copper(II) complexes of the pyridoxal derivatives may have a great potential as novel antitumor drugs and suggest further studies of selectivity against tumor and normal cells as well as antitumor tests in vivo.

Acknowledgements We gratefully acknowledge the financial support of FAPDF, CAPES, CNPq and FINEP/CTINFRA.

Funding Funding was provided by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal Funda de Apoio? Pesquisa do Distrito Federal (Grant No. 0193.001545/2017).

References

1. Abu-Dief AM, Mohamed IMA (2015) Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci 4:119–133
2. Anaconda JR, Noriega N, Camus J (2015) Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc 137:16–22
3. Bagihalli GB, Avaji PG, Patil SA, Badami PS (2008) Eur J Med Chem 43:2639–2649
4. Conner EM, Reglinski J, Smith WE, Zeitlin IJ (2017) Biometals 30:423–439
5. Pelosi G, Bisceglie F, Bignami F, Ronzi P, Schiavone P, Re MC, Casoli C, Pilotti E (2010) J Med Chem 53:8765–8769
6. Chang H-Q, Jia L, Xu J, Zhu T-F, Xu Z-Q, Chen R-H, Ma T-L, Wang Y, Wu W-N (2016) J Mol Struct 1106:366–372
7. Vidovic D, Radulovic A, Jevtovic V (2011) Polyhedron 30:16–21

8. Cui Z, Li Y, Ling Y, Huang J, Cui J, Wang R, Yang X (2010) *Eur J Med Chem* 45:5576–5584
9. Ali MA, Tan AL, Mirza AH, Santos JH, Abdullah AHBH (2012) *Transit Met Chem* 37:651–659
10. Zangrando E, Begum MS, Sheikh MC, Miyatake R, Hossain MM, Alam MM, Hasnat MA, Halim MA, Ahmed S, Rahman MN, Ghosh A (2017) *Arab J Chem* 10:172–184
11. Casas JS, Couce MD, Sordo J (2012) *Coord Chem Rev* 256:3036–3062
12. Begum MS, Zangrando E, Sheikh MC, Miyatake R, Howlader MBH, Rahman MN, Ghosh A (2017) *Transit Met Chem* 42:553–563
13. Zangrando E, Islam MT, Islam MA-AAA, Sheikh MC, Tarafder MTH, Miyatake R, Zahan R, Hossain MA (2015) *Inorg Chim Acta* 427:278–284
14. Jansson PJ, Sharpe PC, Bernhardt PV, Richardson DR (2010) *J Med Chem* 53:5759–5769
15. Wang Y-T, Fang Y, Zhao M, Li M-X, Ji Y-M, Han Q-X (2017) *MedChemComm* 8:2125–2132
16. Liu Y-H, Li A, Shao J, Xie C-Z, Song X-Q, Bao W-G, Xu J-Y (2016) *Dalton Trans* 45:8036–8049
17. Park KC, Fouani L, Jansson PJ, Wooi D, Sahni S, Lane DJR, Palanimuthu D, Lok HC, Kovacevic Z, Huang MLH, Kalinowski DS, Richardson DR (2016) *Metallomics* 8:874–886
18. Piri Z, Moradi-Shoaili Z, Assoud A (2017) *Inorg Chem Commun* 84:122–126
19. Elsayed SA, Noufal AM, El-Hendawy AM (2017) *J Mol Struct* 1144:120–128
20. Manikandan R, Vijayan P, Anitha P, Prakash G, Viswanathamurthi P, Butcher RJ, Velmurugan K, Nandhakumar R (2014) *Inorg Chim Acta* 421:80–90
21. I.M.W. SMART and SAINT (1999) Area detector control integration software. Bruker Analytical X-ray Instruments, Billerica
22. Sheldrick GM (2008) *Acta Crystallogr Sect A* 64:112–122
23. Sheldrick G (2015) *Acta Crystallogr Sect C* 71:3–8
24. Farrugia LJ (1997) *J Appl Crystallogr* 30:565
25. Putz H, Brandenburg GbR K. Crystal impact. Kreuzherrenstr. 102, 53227 Bonn, Germany
26. de Lima AP, Pereira FdC, Vilanova-Costa CAST, Ribeiro AdSBB, Pavanin LA, Dos Santos WB, Silveira-Lacerda EdP (2010) *J Biosci* 35:371–378
27. Bronikowska J, Szliszka E, Jaworska D, Czuba ZP, Krol W (2012) *Molecules* 17:6449–6464
28. Syed Abdul Rahman SN, Abdul Wahab N, Abd Malek SN (2013) *Evid Based Complement Alternat Med* 257108:20
29. Rogalska A, Gajek A, Marczak A (2013) *Cell Biol Int* 37:1330–1339
30. Lima AP, Pereira FC, Almeida MAP, Mello FMS, Pires WC, Pinto TM, Delella FK, Felisbino SL, Moreno V, Batista AA, Silveira-Lacerda EP (2014) *PLoS ONE* 9(10):e105865
31. Hamid MHSA, Said ANAH, Mirza AH, Karim MR, Arifuz-zaman M, Akbar Ali M, Bernhardt PV (2016) *Inorg Chim Acta* 453:742–750
32. Haddad AZ, Cronin SP, Mashuta MS, Buchanan RM, Grapperhaus CA (2017) *Inorg Chem* 56:11254–11265
33. Low ML, Maigre L, Tahir MIM, Tiekink ERT, Dorlet P, Guillot R, Ravoof TB, Rosli R, Pagès J-M, Policar C, Delsuc N, Crouse KA (2016) *Eur J Med Chem* 120:1–12
34. Ravoof TBSA, Crouse KA, Tiekink ERT, Tahir MIM, Yusuf ENM, Rosli R (2017) *Polyhedron* 133:383–392
35. Leovac VM, Jevtovic V, Jovanović L, Bogdanović G (2005) *J Serb Chem Soc* 70(3):393–422
36. Mohamed Subarkhan M, Prabhu RN, Raj Kumar R, Ramesh R (2016) *RSC Adv* 6:25082–25093
37. Jakusch T, Kozma K, Enyedy ÉA, May NV, Roller A, Kowol CR, Keppler BK, Kiss T (2017) *Inorg Chim Acta* 472:243–253
38. Ma Z-Y, Shao J, Bao W-G, Qiang Z-Y, Xu J-Y (2015) *J Coord Chem* 68:277–294
39. Azarkish M, Akbari A, Sedaghat T, Simpson J (2018) *J Mol Struct* 1156:34–42
40. Takjoo R, Centore R, Hakimi M, Ali Beyramabadi S, Morsali A (2011) *Inorg Chim Acta* 371:36–41
41. Geary WJ (1971) *Coord Chem Rev* 7:81–122
42. Gatto CC, Miguel PM, Almeida CM, Santiago PHO, Paier CRK, Pessoa C (2017) *Transit Met Chem* 42:503–508
43. Dobrova A, Platzer S, Bacher F, Milunovic MNM, Dobrov A, Spengler G, Enyedy ÉA, Novitchi G, Arion VB (2016) *Dalton Trans* 45:13427–13439
44. Milunovic MNM, Enyedy ÉA, Nagy NV, Kiss T, Trondl R, Jakupc MA, Keppler BK, Krachler R, Novitchi G, Arion VB (2012) *Inorg Chem* 51:9309–9321
45. Bacher F, Enyedy ÉA, Nagy NV, Rockenbauer A, Bognár GM, Trondl R, Novak MS, Klapproth E, Kiss T, Arion VB (2013) *Inorg Chem* 52:8895–8908
46. Mello-Andrade F, da Costa WL, Pires WC, Pereira FC, Cardoso CG, Lino-Junior RS, Irusta VRC, Carneiro CC, de Melo-Reis PR, Castro CH, Almeida MAP, Batista AA, Silveira-Lacerda EP (2017) *Tumour Biol* 39:1010428317695933
47. Garibal J, Hollville É, Renouf B, Tétaud C, Wiels J (2010) *Cell Signal* 22:467–475
48. Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AMdC, Bortolotto T, Fischer FL, Terenzi H, Neves A, Pereira-Maia EC (2011) *Inorg Chem* 50:6414–6424
49. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) *Nature* 366:701–704
50. Porter AG, Janicke RU (1999) *Cell Death Differ* 6:99–104