

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GERAL E INORGÂNICA

Joana Souza Oliveira Galavotti

**Síntese, caracterização e avaliação de atividades biológicas de
tiossemicarbazonas e semicarbazonas vanilínicas e seus derivados de
dinitrosilos de ferro**

Araraquara
2019

Joana Souza Oliveira Galavotti

Síntese, caracterização e avaliação de atividades biológicas de
tiossemicarbazonas e semicarbazonas vanilínicas e seus derivados de dinitrosilos
de ferro

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Galavotti, Joana Souza Oliveira
G146s Síntese, caracterização e avaliação de atividades
biológicas de tiossemicarbazonas e semicarbazonas
vanilínicas e seus derivados de dinitrosilos de ferro / Joana
Souza Oliveira Galavotti. – Araraquara : [s.n.], 2019
108 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: José Clayston Melo Pereira

1. Complexos metálicos de transição. 2. Câncer.
3. Tiossemicarbazonas. 4. Oxido nítrico. 5. Glutathione.
I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese, caracterização e avaliação de atividades biológicas de tiossemicarbazonas e semicarbazonas vanílicas e seus derivados de dinitrosilos de ferro"

AUTORA: JOANA SOUZA OLIVEIRA GALAVOTTI

ORIENTADOR: JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



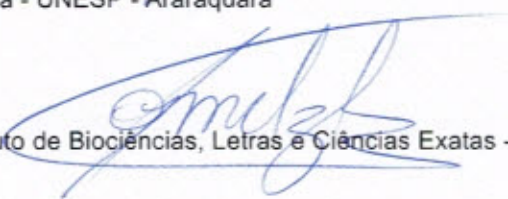
Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA

Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO

Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. GUSTAVO METZKER

Departamento de Química Analítica e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Araraquara, 08 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

Joana Souza Oliveira Galavotti

Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara - UNESP.
Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Jardim Quitandinha - Araraquara/SP - CEP 14800-060. E-mail: joanagalavotti@hotmail.com.

Formação Acadêmica

2017-2019 Mestrado em Química

- Grande área: Ciências Exatas e da Terra.
- Subárea: Química Inorgânica / Especialidade: Compostos organo-metálicos.
- Título: Síntese, caracterização e avaliação da atividade anticâncer de dinitrosilos de ferro contendo derivados vanilínicos de tiossemicarbazona e semicarbazona.
- Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira. (clayston@iq.unesp.br).
- Agência financiadora: CAPES.

2013-2016 Graduação em Bacharelado em Química

- Grande área: Química Orgânica.
- Subárea: Química Orgânica / Especialidade: Produtos naturais.
- Título: Perfil químico de mudas de *Inga marginata* usadas em reflorestamento.
- Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro.

Experiência Profissional e Didática

2018 - 2019 Cursinho Geração Near - UNESP

- Professora da disciplina de Biologia no cursinho pré-vestibular Geração Near.
Coordenação: Prof. Dr. Alexandre Campos e Prof^a Dr^a Cibele Rozenfeld.

2016 Monitoria - UNESP

- Monitoria na disciplina de Estatística no período agosto 2016/dezembro 2016.
Supervisão: Prof. Dr. Jorge Manuel Vieira Capela e Profª Drª Marisa Veiga Capela.

Produções

- Apresentação em painel do trabalho “Análise comparativa do perfil de compostos fenólicos de *Inga marginata* (Fabaceae) por CLAE-DAD na 1ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Ano: 2016

Participação em eventos

1.1 SEMANA DA QUÍMICA

- 2013: Química forense. 12 horas.
- 2013: Química medicinal. 12 horas.
- 2015: Técnicas analíticas de determinação com ênfase em sensor óptico, cromatografia líquida e espectrometria de massas. 12 horas.
- 2017: Cerveja artesanal. 12 horas.
- 2018: Química Supramolecular: aplicações em materiais e dispositivos. 12 horas.
- 2018: Nanotecnologia aplicada à saúde. 12 horas.

1.2. EVEQ

- 2018: Mapas conceituais como ferramenta avaliativa no ensino de Ciências. 4 horas.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, a Jesus e a Nossa Senhora por toda a força e por todo o amor e a Creusa Souza Oliveira por ser essa mãe que eu tanto amo e mulher que tanto admiro.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, a Jesus, a Nossa Senhora Aparecida, ao Mestre Meishu Sama e aos irmãos espirituais por toda a ajuda, o amor e a força que me deram. Em todos os momentos sei que não estive sozinha.

Ao meu orientador e professor José Clayston Melo Pereira pela oportunidade e atenção com o meu aprendizado e a pesquisa. Meus sinceros agradecimentos por essa oportunidade única de conhecimento.

À todo o grupo do departamento de Química Geral e Inorgânica que de alguma forma me proporcionou bons momentos e aprendizado. Em especial, ao Prof. Dr. Adelino Vieira Godoy de Godoy Netto por todas as palavras estimuladoras e pelo conhecimento compartilhado, ao Rafael Romano Domenegueti por toda a ajuda e momentos de descontração, a Lígia Renata Firmino pelo apoio e ao Renan Diego Zanetti pela amizade e aprendizado. À Débora Lemos pelos ensaios biológicos realizados e aprendizado.

Ao grupo do departamento de Bioquímica e Tecnologia pelo acolhimento. Em especial, ao Prof. Dr. Saulo Garrido pela oportunidade em vivenciar novas experiências e à Carolina Zambom e Fauller Henrique pelo ensinamento, paciência e amizade.

À minha mãe Creusa Souza Oliveira por ser simplesmente a pessoa mais importante da minha vida e o meu grande motivo pra seguir em frente. Seu amor, seu carinho, sua abnegação, sua felicidade a cada sorriso meu e sua preocupação são tão incondicionais quanto o amor que sinto por você. Obrigada por tudo.

Ao Pedro Henrique por ser tão especial a ponto de tornar a caminhada mais alegre. Aos meus amigos Gustavo, Raul, Patrícia, Adrielle, Thaís, Thamiris, Flávia, Giovanni, Luís, Marcelo, Renan, Marcel e Alexandre por todos os momentos alegres e presença em momentos difíceis. À família formada na Casa I por dividir os mais diversos sentimentos, entre eles, o amor que temos uns aos outros - Leonardo, Mirian, Thiago, Toshi, Thainá, Patrícia, Francine e Fernanda.

Aos técnicos da UNESP que sempre me ajudaram e tornaram-se pessoas muito queridas. Meus mais sinceros agradecimentos ao Albertinho, Lucinéia, Nivaldo, João e Juliana. Aos funcionários da biblioteca, amigos de longa data.

Aos amigos da Casa dos Espíritos de Rio Claro e da Sociedade Beneficente Obreiros do Bem de Araraquara por toda a atenção, as palavras acolhedoras e encorajamento.

À FAPESP, CAPES, CNPq e PROEX.

Ao Instituto de Química da UNESP Araraquara pela infra-estrutura oferecida.

“Espera no Senhor, anima-te e Ele fortalecerá o teu coração; espera, pois no Senhor.”
Versículo 14, Salmo 27.

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas
qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”
Chico Xavier, pelo espírito Emmanuel.

RESUMO

O câncer é uma dos principais problemas de saúde que afeta e mata milhões de pessoas. Diversos tipos de tratamento já foram propostos, entretanto, alguns se apresentam muitas vezes tóxicos ao corpo e/ou ineficientes de acordo com as características particulares do organismo. Dentre as propostas de tratamento está o uso do complexo precursor $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{CO})_2]$ para síntese de complexos $[\text{Fe}(\text{NO})_2 \text{Ligante}]$ em que se encontram a vanilina tiossemicarbazona (VTS) e a vanilina semicarbazona (VSC) como ligantes. Busca-se, por meio desses, a possibilidade de inibição do sistema enzimático da glutathione - glutathione / glutathione transferases - conhecido por restringir a ação da cisplatina através da catalisação da conjugação da glutathione com o complexo - e através do uso dos dinitrosilos de ferro (DNICs) e da liberação do ligante orgânico obter uma possível atuação farmacológica. Neste trabalho, foram utilizadas técnicas como Análise Elementar, Espectroscopia no UV-Vis, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, Ressonância Paramagnética de Elétron e Espectrometria de Massas para a caracterização dos ligantes que foram também avaliados por ensaio citotóxico frente a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) e bacteriano por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os complexos sintetizados foram avaliados por técnicas espectroscópicas e espectrometria de massas.

Palavras-chave: Câncer. Tiossemicarbazonas. Óxido nítrico

ABSTRACT

Cancer is one of the major health problems that affects and kills millions of people. Several types of treatment have been proposed, however, some of them are often toxic to the body and / or inefficient according to the particular characteristics of the organism. Among the treatment proposals is the use of the precursor complex $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{CO})_2]$ for synthesis of complexes $[\text{Fe}(\text{NO})_2\text{Binder}]$ in which are the vanillin thiosemicarbazone (VTS) and vanillin semicarbazone (VSC) as ligands. The aim is to inhibit the enzymatic system of glutathione glutathione / glutathione transferases known to restrict the action of cisplatin by catalyzing the conjugation of glutathione to the complex and through the use of iron dinitrosilos (DNICs) and the release of the organic ligand to obtain a possible pharmacological action. In this project, were used techniques such as Elementary Analysis, UV-Vis Spectroscopy, Infrared Spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Electron Paramagnetic Resonance and Mass Spectrometry for the characterization of ligands that were also evaluated by cytotoxic assay against the MCF lineage -7 (human mammary adenocarcinoma) and bacterial by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The synthesized complexes were evaluated by spectroscopic techniques and mass spectrometry.

Keywords: Cancer. Thiosemicarbazones. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Figura 2 - Esquematização da interação GSTs - Dinitrosilo de ferro

Figura 3 - Estrutura dos complexos do tipo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{X})_2]$.

Figura 4 - Modo de ligação M-NO

Figura 5 - Ligações e OM para M-NO

Figura 6 - Orbitais moleculares para as espécies de NO

Figura 7 - Vanilina semicarbazona.

Figura 8 - Vanilina tiossemicarbazona.

Figura 9 - Ilustração do arranjo estrutural de tiossemicarbazonas.

Figura 10 - Representação dos tipos de coordenação que as tiossemicarbazonas podem adquirir.

Figura 11 - Numeração proposta para os ligantes de tiossemicarbazona (TSC).

Figura 12 - Ilustração do complexo esperado.

Figura 13 - Ilustração do sistema de refluxo da síntese de complexo precursor.

Figura 14 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VATSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm(b).

Figura 15 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAMTSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm (b).

Figura 16 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAETSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm (b).

Figura 17 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAPTSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 335 nm (b).

Figura 18 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAPSCO (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 315 nm (b).

Figura 19 - Espectros dos ligantes na região do Infravermelho.

Figura 20 - Formas tautoméricas possíveis para as tiossemicarbazonas.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de VATSC (DMSO.d6, 600MHz).

Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C de VATSC (DMSO.d6, 150 MHz).

Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H de VAMTSC (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C de VAMTSC (DMSO.d6, 150 MHz).

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H de VAETSC (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C de VAETSC (DMSO.d6, 150 MHz).

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H de VAPTSC (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 28 - Espectro de RMN ^{13}C de VAPTSC (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 29 - Espectro de RMN de HSQC ^1H - ^{13}C - J_{CH} de VAPTSC (DMSO.d6, 600 e 150 MHz).

Figura 30 - Espectro de RMN de HMBC ^1H - ^{13}C de VAPTSC (DMSO.d6, 600 e 150 MHz).

Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H de VAPSCO (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C de VAPSCO (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 33 - Espectro de massas obtido por ESI de VATSC em solução metanólica (modo positivo).

Figura 34 - Espectro de massas obtido por ESI de VATSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações.

Figura 35 - Espectro de massas obtido por ESI de VAMTSC em solução metanólica (modo positivo).

Figura 36 - Espectro de massas obtido por ESI de VAMTSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações.

Figura 37 - Espectro de massas obtido por ESI de VAETSC em solução metanólica (modo positivo).

Figura 38 - Espectro de massas obtido por ESI de VAETSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações

Figura 39 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPTSC em solução metanólica (modo positivo)

Figura 40 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPTSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações

Figura 41 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPSCO em solução metanólica (modo positivo).

Figura 42 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPSCO em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações.

Figura 43 - Perfil geral de atividades biológicas das tiossemicarbazonas

Figura 44 - Ensaio citotóxico VATSC.

Figura 45 - Ensaio citotóxico VAMTSC.

Figura 46 - Ensaio citotóxico VAETSC.

Figura 47 - Ensaio citotóxico VAPTSC.

Figura 48 - Ensaio citotóxico VAPSCO.

Figura 49 - Tiossemicarbazona com atividade antibacteriana descrita em literatura.

Figura 50 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VAETSC.

Figura 51 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VAMTSC.

Figura 52 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VATSC.

Figura 53 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VAPSCO.

Figura 54 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VATSC.

Figura 55 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAMTSC.

Figura 56 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAETSC.

Figura 57 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAPTSC.

Figura 58 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAPSCO.

Figura 59 - Imagem da síntese do complexo precursor a) Balão de síntese b) Dicarbonildinitrosilferro.

Figura 60 - Espectro de Infravermelho para o precursor $[\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{NO})_2]$.

Figura 61 - Destaque da absorção de νNO .

Figura 62 - Comparação dos espectros dos complexos na região do Infravermelho.

Figura 63 - Comparação dos espectros de VATSC e $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{TSC})]$ na região do infravermelho.

Figura 64 - Comparação dos espectros de VAMTSC e $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{MTSC})]$ na região do infravermelho.

Figura 65 - Comparação dos espectros de VAETSC e $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{ETSC})]$ na região do infravermelho.

Figura 66 - Comparação dos espectros de VAPTSC e $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{PTSC})]$ na região do infravermelho.

Figura 67 - Comparação dos espectros de VAPSCO e $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{PSCO})]$ na região do infravermelho.

Figura 68 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{ETSC})]$ (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm (B).

Figura 69 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{PTSC})]$ (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 334 nm.

Figura 70 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{TSC})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 71 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{MTSC})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 72 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{ETSC})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 73 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{PTSC})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 74 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{PSCO})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 75 - Espectro comparativo de RMN de ^1H para $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ e VAETSC

Figura 76 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VATSC})]$ em forma sólida.

Figura 77 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAMTSC})]$ em forma sólida.

Figura 78 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})]$ em forma sólida.

Figura 79 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})]$ em forma sólida.

Figura 80 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPSCO})]$ em forma sólida.

Figura 81 - Espectroscopia na região do infravermelho dos complexos sintetizados.

Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de $[\text{Fe}(\text{NO})_2 (\text{Exc. VAETSC})]$ (DMSO.d6, 600 MHz)

Figura 83 - Espectro de RMN ^{13}C de $[\text{Fe}(\text{NO})_2 (\text{Exc. VAETSC})]$ (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 84 - Espectro de RMN de HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ de $[\text{Fe}(\text{NO})_2 (\text{Exc. VAETSC})]$ (DMSO.d6, 600 e 150 MHz).

Figura 85- Espectro de RMN de HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de $[\text{Fe}(\text{NO})_2 (\text{Exc. VAETSC})]$ (DMSO.d6, 600 e 150 MHz).

Figura 86 - Espectros de RMN de ^1H comparativos com auxílio de TOCSY 1D da amostra $[\text{Fe}(\text{NO})_2 (\text{Exc. ETSC})]$ (DMSO.d6, 600 MHz).

Figura 87 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc.VAETSC})]$ a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm (b).

Figura 88 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc.Metal})]$ (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm (b).

Figura 89 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. VAETSC})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 90 - Espectro de massas obtido por ESI de $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC}) (\text{Exc. Metal})]$ em solução metanólica (modo positivo).

Figura 91 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. Metal})]$ em forma sólida.

Figura 92 - Espectro de EPR do complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. VAETSC})]$ em forma sólida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da análise elementar de (C,H,N) para os ligantes; valores experimentais (VE), valores calculados (VC) e erro.

Tabela 2 – Valores de absorção e absortividade molar em UV-Vis para VATSC, VAMTSC, VAETSC, VAPTSC e VAPSCO.

Tabela 3 - Principais atribuições de cada ligante na Espectroscopia na região do Infravermelho.

Tabela 4 - Dados de RMN 1D de VATSC.

Tabela 5 - Dados de RMN 1D de VAMTSC.

Tabela 6 - Dados de RMN 1D de VAETSC.

Tabela 7 - Dados de RMN 1D e 2D de VAPTSC.

Tabela 8 - Dados de RMN 1D e 2D de VAPSCO

Tabela 9 - Dados comparativos de RMN de ^1H e ^{13}C DEPT 1D entre VAETSC e $[\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc.VAETSC)].

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Duplete
<i>dd</i>	Duplo duplete
MS	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
Hz	Hertz
ESI	Ionização por eletrospray
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	massa/carga
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<i>s</i>	Simpleto
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer	19
1.1 Dinitrosilados de ferro	22
1.3 Vanilina e ligantes derivados	27
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos específicos	32
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
3.1 Consumíveis	33
3.2 Equipamentos	34
3.3 Síntese de tiossemicarbazonas	34
3.4 Síntese do complexo precursor: dinitrosilo de ferro (DNIC)	35
3.5 Síntese dos complexos	37
3.6 Ensaios biológicos	37
3.6.1 Ensaio citotóxico	37
3.6.1 Padronização das suspensões bacterianas	38
3.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Ligantes	39
4.1.1 Análise Elementar	39
4.1.2 Espectroscopia na região UV/Vis	40
4.1.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho	43
4.1.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	45
4.1.5 Espectrometria de Massas	61
4.1.6 Ensaios biológicos	71
4.2 Complexos	79
4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho	81
4.2.2 Espectroscopia na região UV/Vis	86
4.2.3 Espectrometria de Massas	87
4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear	90
4.2.5 Ressonância Paramagnética de Elétron	90
4.3 Novas propostas de síntese	93
4.3.1 Espectro de absorção na região do Infravermelho	94
4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear	94
4.3.3 Espectroscopia na região UV/Vis	99
4.3.4 Espectrometria de massas	101
4.3.5 Ressonância paramagnética de elétron	102

5	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum a capacidade de crescimento celular desordenado¹ sendo, atualmente, um problema de saúde pública mundial, seja pelo aumento na sua prevalência, como também, pelos investimentos em ações abrangentes, pelo tempo da detecção da doença e da assistência aos pacientes, entre outros fatores.²

Em 2012, a estimativa mundial indicou que ocorreram 14,1 milhões de novos casos de câncer e, ainda, 8,2 milhões de óbitos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a cada ano 8,8 milhões de pessoas morrem por conta dessa enfermidade, a maioria em países em desenvolvimento, superando a estimativa de 2012. Nesses países as ocorrências de câncer associadas às infecções ainda é alta, resultando em câncer de colo do útero, estômago e esôfago entre os mais comuns. Já nos países desenvolvidos os tipos de câncer predominantes foram os associados à urbanização e ao desenvolvimento, indicando assim, câncer de pulmão, próstata e mama como os mais comuns³. De acordo com a OMS, as infecções que podem causar câncer são responsáveis por 20% das mortes por câncer em países em desenvolvimento e, em contrapartida, esse índice é de 7% nos países desenvolvidos.

No Brasil estima-se que entre 2018-2019 ocorram 600 mil casos novos de câncer, dentre os tipos mais comuns estão o de próstata, mama e pulmão (**Figura 1**):

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

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma

Fonte - Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil (INCA)

O câncer pode ser induzido por fatores internos, ou seja, aqueles associados à genética humana e por fatores externos quando o meio, os hábitos e costumes estão envolvidos como fatores de risco ou por ambos. Por fatores genéticos as células passam por alterações devido aos genes específicos: oncogenes e os supressores de tumores^{3,4}. Os proto-oncogenes são genes responsáveis pelo crescimento celular e quando passam por mutações, inserções, deleções ou justaposição provocam um crescimento desordenado e são então denominados de oncogenes. Já os supressores de tumor, designados em atividades de divisão celular, apoptose e reparação de danos no DNA levam ao desenvolvimento descontrolado de células por sua inativação.^{4,5}

Por conta das mutações gênicas as células cancerígenas produzidas adquirem grande capacidade de proliferação e resistência a sinais antiproliferativos e apoptóticos (morte celular programada)^{6,7}, perda de função e da capacidade de diferenciação ou especialização e perda das propriedades adesivas da membrana plasmática que permitem o reconhecimento celular⁶. Além disso, tais células podem produzir vasos sanguíneos e invadir outros tecidos, processos denominados, respectivamente, de angiogênese e metástase, essa última, formadora dos tumores malignos e reconhecida como a maior causa de mortes em pacientes com câncer.⁸

Dentre as formas de tratamento para a neoplasia estão o uso de cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia que dependem da ressecabilidade do tumor e da viabilidade de acesso por conta da preservação dos órgãos envolvidos⁹. A toxicidade e a combinação de métodos de tratamento já foram discutidas em estudos científicos, assim como, a resistência apresentada pela doença, evidenciando que a dosagem intervém na sobrevivência do paciente e em como a cirurgia pode piorar o quadro clínico, ressaltando algumas das características consideradas no tratamento as quais ainda incluem o custo e a preferência de acordo com o estado de saúde^{10,11}.

Na dinâmica do organismo humano, é necessário compreender e buscar métodos alternativos de tratamento, onde os compostos de coordenação conquistaram destaque com a cisplatina: um dos fármacos mais conhecidos e utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, entre eles, cancro da cabeça e pescoço, pulmão, estômago, testicular, ovariano, esofágico, entre outros. Porém, tal tratamento apresentou-se limitado devido a complicações tóxicas causadas pelo complexo, como neurotoxicidade (danos ao sistema nervoso), a nefrotoxicidade (danos aos rins), a ototoxicidade (perda de audição) e mielotoxicidade (supressão da medula óssea)¹².

No corpo humano há um complexo enzimático responsável por dificultar a ação de fármacos contra o câncer, como, por exemplo, a cisplatina, trata-se da família glutathione S-transferases (GSTs). Essa família de enzimas é responsável por proteger a célula de compostos tóxicos endógenos ou exógenos através da conjugação de um átomo de enxofre ao centro eletrofílico do composto alvo. Em literatura, se encontra relatos da família GSTs interagindo com dinitrosilos de ferro pelo sítio G da enzima, através da coordenação do ferro com a hidroxila de Tyr-7 e interações adicionais de van der Waals de porções de NO com Ile-104 e Tyr-108 (**Figura 2**). Essa interação é vista com surpresa, pois o sítio G reconhece, predominantemente, GSH e alguns análogos. Por conta dessa resistência apresentada pelo corpo, se encontra em literatura propostas de utilização de complexos contendo fármacos orgânicos^{13,14,43}.

Nesse contexto, este trabalho propõe o estudo de dinitrosilos de ferro - $\{Fe(NO)_2\}$ - a partir do uso de CO (carbonila) como ligante ao complexo precursor - $Fe(NO)_2(CO)_2$ - e, posteriormente, a formação de complexos de fórmula $Fe(NO)_2(L_2)$ a partir da substituição de grupos CO por ligantes orgânicos como os derivados vanilínicos de tiossemicarbazonas e semicarbazona. Dessa forma, espera-se que em meio biológico, o $Fe(NO)_2(L_2)$ seja capaz de liberar os ligantes orgânicos (L) para atuarem como fármacos no organismo, enquanto o $Fe(NO)_2$ acabe por inibir o sistema enzimático da glutathione.

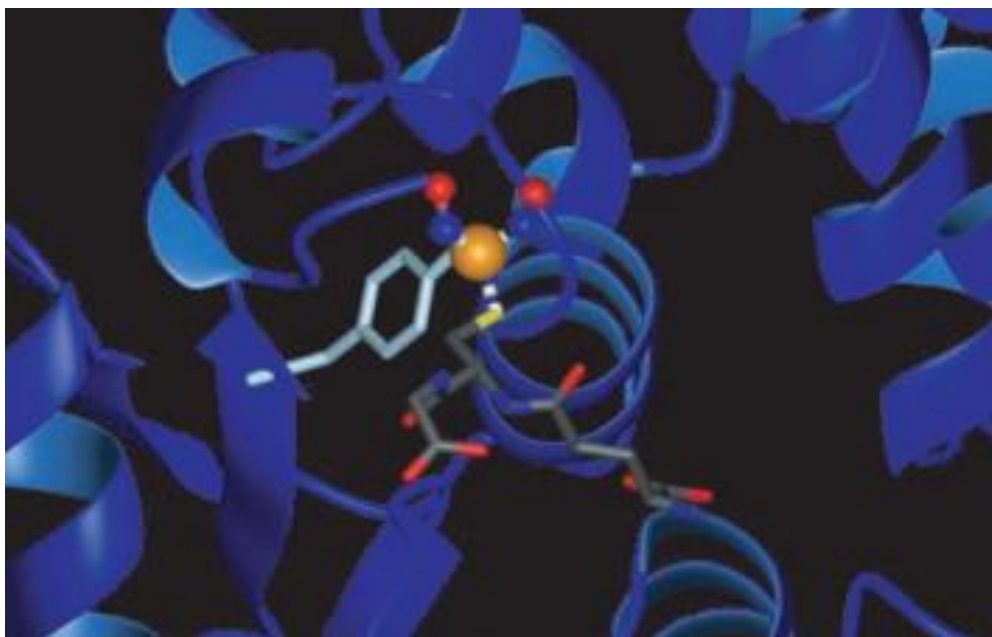


Figura 2 - Esquematização da interação GSTs - Dinitrosilo de ferro.

Fonte: Adaptado de De Maria, et al (2003).

1.2 Infecções bacterianas

Infecções bacterianas são responsáveis por um grande número de óbitos inesperados em doenças infecciosas. Segundo dados da OMS (2016), as bactérias encontradas em meio hospitalar e no meio da comunidade são as que mais merecem atenção, devido à resistência a antibióticos tradicionalmente usados. A lista organizada pela OMS aponta os agentes patogênicos prioritários resistentes aos antibióticos, em que estão presentes bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, seguidas da *Salmonella spp*

Dentre essas, a *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa presente no trato gastrointestinal humano e de outros animais e é auxiliadora da digestão. Certos tipos de *E. coli* podem causar dores abdominais, vômitos, diarreias, infecções no trato urinário, meningite neonatal e levar o paciente a um quadro clínico grave por destruição das células vermelhas e, conseqüentemente, insuficiência renal. Já a *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva responsável por parte das infecções hospitalares, incluindo a sepse (infecção generalizada), infecções na pele, nos tecidos e adquiridas na comunidade, como também, participa de intoxicação alimentar. Sua patogenicidade é devida as toxinas, invasividade e resistência a antibióticos.

As bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram selecionadas, neste trabalho, para ensaios biológicos com tiossemicarbazonas e semicarbazona, a fins de estudo do grau de inibição causado por esses compostos nos patógenos mencionados.

1.1 Dinitrosilados de ferro

Os dinitrosilos de ferro (DNICs), **Figura 3**, que contém dois grupos NO em sua estrutura e ligantes (X) como grupos proteicos, imidazóis e tióis, são conhecidos por serem capazes de estocar e transportar o regulador endógeno universal de processos metabólicos NO. O óxido nítrico é biossintetizado de forma endógena no corpo a partir de L-arginina, oxigênio e NADPH, sendo modulador de funções fisiológicas, como o relaxamento do músculo liso, transmissão neural, regulador da pressão sanguínea, inibição de agregação plaquetária, ativação / inibição de expressão gênica e indução de apoptose. No sistema imunológico é gerado por macrófagos e neutrófilos e é citotóxico para patógenos e células tumorais em certos níveis¹⁶.

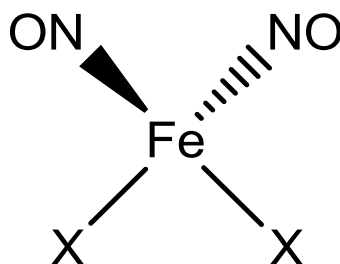


Figura 3 - Estrutura dos complexos do tipo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{X})_2]$

Quando o grupo NO está presente em complexos a ligação entre o metal e o NO ocorre, geralmente, através do átomo de nitrogênio formando os complexos nitrosilos ($\text{M}-\text{NO}$). Essa ligação se dá por meio de doação de densidade eletrônica do nitrogênio para o metal através de uma ligação σ e uma retrodoação dos orbitais $d\pi$ ocupados do metal para os orbitais π^* do grupo NO que atuam como ótimos π receptores, conforme pode ser observado na **Figura 4**. Ademais, o grupo NO pode assumir diferentes estados de oxidação para formar ligações, sendo elas o NO (óxido nítrico), NO^+ (íon nitrosônio) e NO^- (íon nitroxyl) como representado na **Figura 5**. Quando ocorre a perda de um elétron a ligação N-O é fortalecida, pois a ordem de ligação aumenta, enquanto o ganho de um elétron ao orbital π^* a enfraquece já que a ordem de ligação diminui^{20,40,44}. Para melhor compreensão dessa característica, conta-se com o auxílio dos orbitais moleculares representados na **Figura 6**.

Para os DNICs - $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}$ - é adotada a notação de Enemark-Feltham devido aos diferentes estados de oxidação e de ligação que o grupo NO pode assumir²⁰, assim, é considerado o número total de elétrons presentes nos orbitais π^* do NO e os elétrons presentes nos orbitais d do metal, refletindo na representação: $\{\text{M}(\text{NO})_x\}^y$. Assim, observa-se em literatura, a descrição dos estados $\text{Fe}(\text{NO})_2^9$, $\text{Fe}(\text{NO})_2^9$ e $\text{Fe}(\text{NO})_2^{10}$ acoplados e $\text{Fe}(\text{NO})_2^{10}$. Em geral, os dinitrosilos de ferro são descritos com configuração d^9 , presença de 17 elétrons e densidade eletrônica ao redor do átomo de ferro²⁰.

Os ligantes presentes nesses compostos podem conter átomos doadores duros e não polarizáveis como oxigênio ou flúor que produzem uma distorção em direção a uma geometria planar, colocando o elétron ímpar em um orbital predominantemente $d_{x^2-y^2}$. Os ligantes que contém átomos doadores mais moles como fósforo ou enxofre dão complexos com um tipo diferente de distorção, levando à colocação do elétron ímpar em um orbital predominantemente d_{z^2} . Ligantes doadores de nitrogênio e halogeneto produzem distorções menores, levando a orbitais moleculares contendo spin com contribuições de uma mistura de orbitais d com geometria de um tetraedro distorcido²⁰.

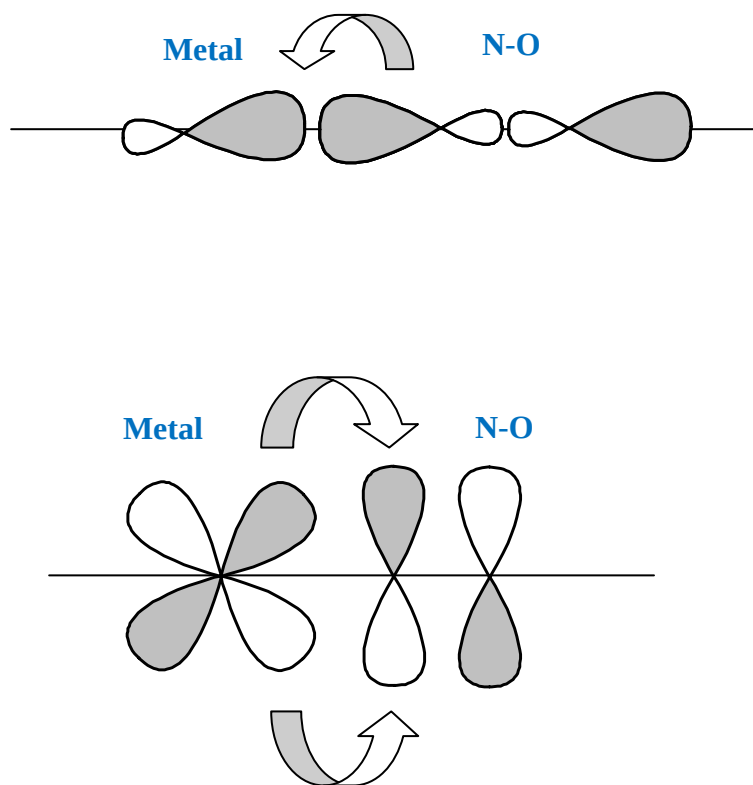
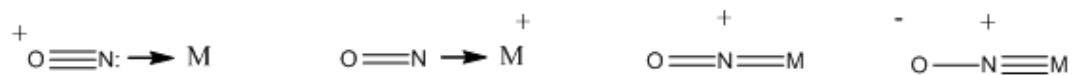
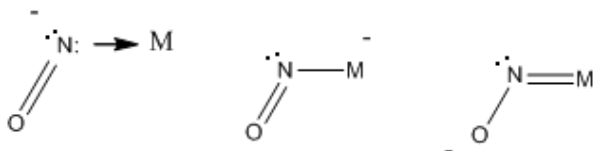


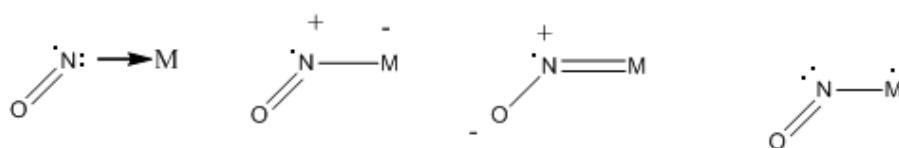
Figura 4 - Modo de ligação M-NO



Nitrosônio (NO^+)

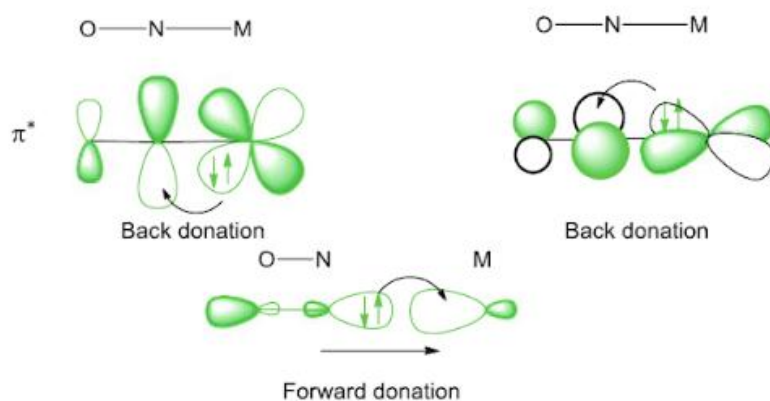


Nitroxyl (NO^-)

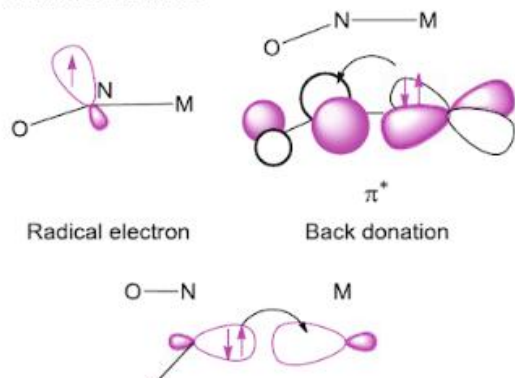


Óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$)

Nitrosonium NO^+



Nitric oxide NO



Nitroxyl NO^-

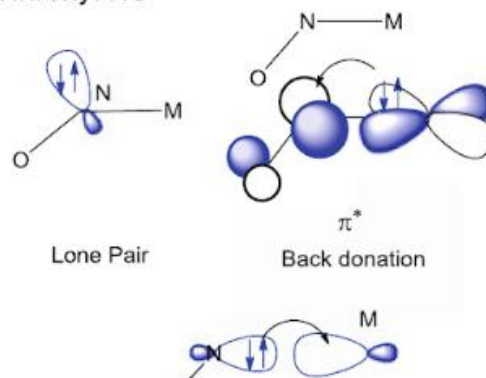


Figura 5 - Ligações e Oms para M-NO

Fonte: Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry, Biochemistry and Medicine (MINGOS, 2014)

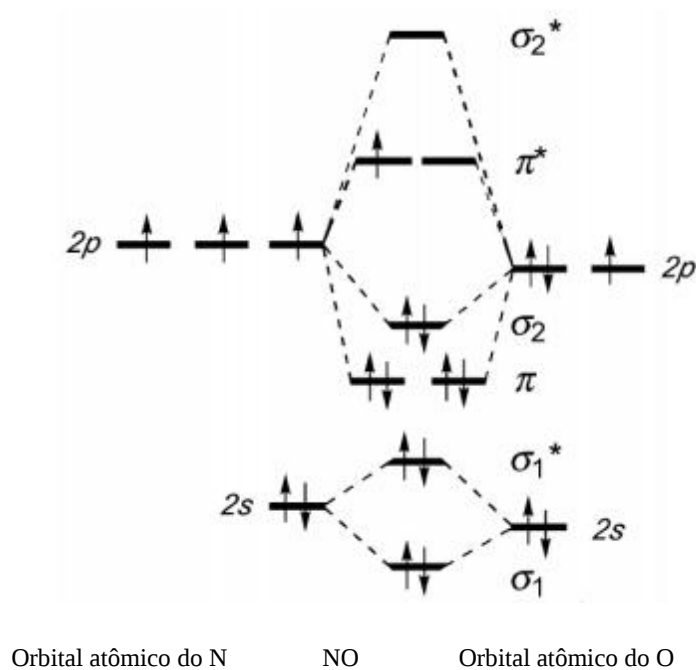
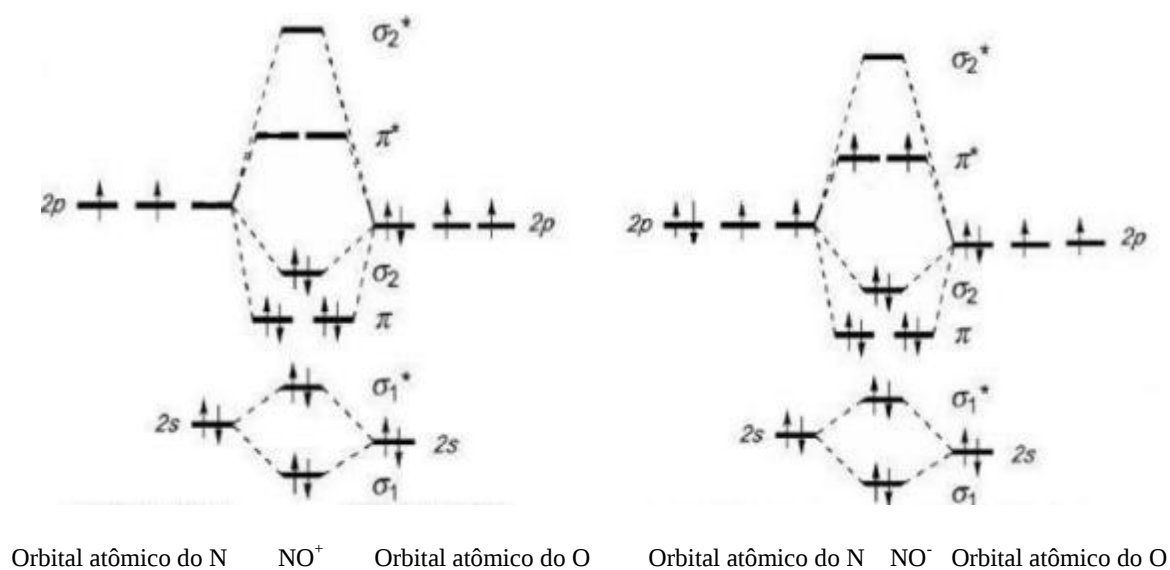


Figura 6 - Orbitais moleculares para as espécies de NO.
Fonte: Neto, 2017.

Em literatura, foi observado que além de estocar e liberar NO, os DNICs que contém ligantes tióis atuam como inibidores de agregação plaquetária e da formação de agregados entre plaquetas e células tumorais, contribuindo para a redução de trombooses e metástases.

Atuam como cardioprotetores e hipotensores, melhoram a elasticidade dos eritrócitos contribuindo para a microcirculação e reduzem o risco de infarto do miocárdio. Estudos demonstraram inibição seletiva de endometriose em ratos,¹⁶ além das propriedades mencionadas com relação a sua interação com a glutathiona.

Dessa forma, este estudo sugere a síntese de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{CO})_2$ como complexo precursor, para que ocorra, a partir da propriedade de ligação mais forte entre M-NO, apenas a substituição dos grupos CO por ligantes orgânicos (L) formando $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{L})_2]$. A hipótese trabalhada é que tais ligantes sejam liberados como fármacos no organismo enquanto o sistema enzimático da glutathiona é conjugado com a estrutura $\text{Fe}(\text{NO})_2$ responsável por inibir tal sistema.

1.3 Vanilina e ligantes derivados

Os complexos dinitrosilados podem utilizar, além dos tióis, ligantes como tiossemicarbazonas e semicarbazonas.

A vanilina ou 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído é um composto orgânico com grande aplicação na área alimentícia, de bebidas e farmacêutica²¹. Na área farmacêutica encontram-se estudos que relatam sua capacidade antimutagênica²², antimicrobiana²¹, antioxidante²¹ e gastroprotetora²³. Estudos demonstraram também interessante atividade anticancerígena na qual a vanilina demonstrou efeito inibidor de crescimento celular, anti-metástico e indutor de apoptose²². A vanilina semicarbazona (VSC) e a vanilina tiossemicarbazona (VTS) apontaram, em estudos anteriores, interessante capacidade de inibição de crescimento celular e aumento do número de macrófagos.^{24,25} Nesse contexto, propõe-se a utilização de derivados de vanilina, como a vanilina semicarbazona e tiossemicarbazona (**Figuras 7 e 8**) como ligantes ao dinitrosilo de ferro. Sabe-se que as tiossemicarbazonas atuam como ligantes N,S-doadores e possuem propriedades farmacológicas de grande potencial, como ação antibacteriana²⁶, antiviral²⁷ e antitumoral²⁸.

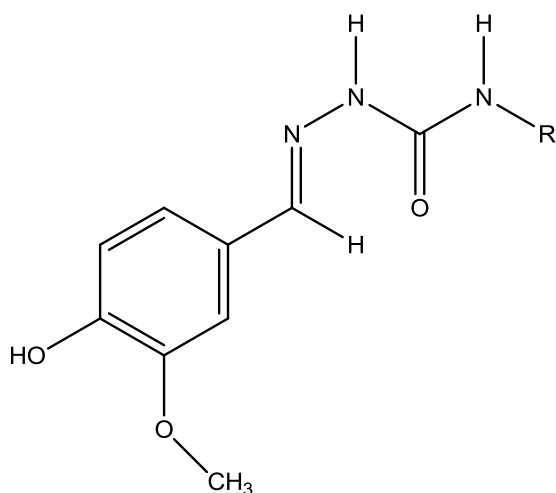


Figura 7 - Vanilina semicarbazona

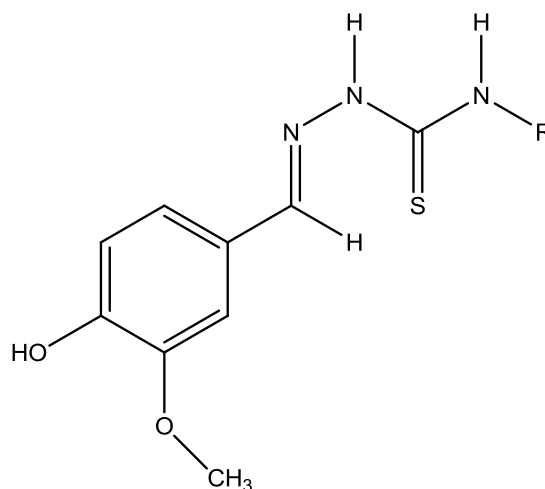


Figura 8 - Vanilina tiossemicarbazona

A estrutura da tiossemicarbazona não substituída é praticamente planar, tendo o enxofre em posição *anti* em relação ao nitrogênio do grupo imina, isso ocorre devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre os hidrogênios da tioamida e o nitrogênio da imina, caso sejam adicionados substituintes ao nitrogênio (N-4) a conformação *sin* pode prevalecer²⁹ (**Figura 9**). Como o ligante pode se coordenar de várias maneiras (**Figura 10**), sendo a principal delas a forma bidentada por meio dos átomos de nitrogênio e enxofre.

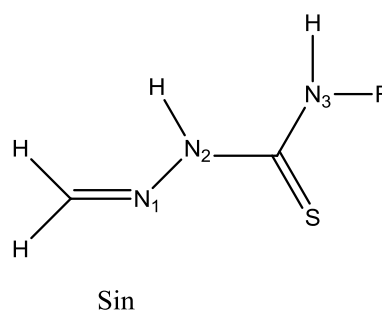
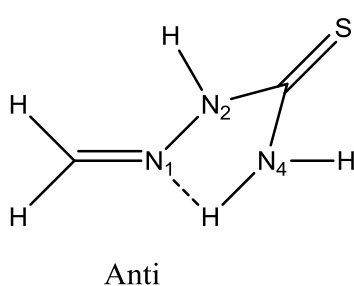


Figura 9 - Ilustração do arranjo estrutural de tiossemicarbazonas

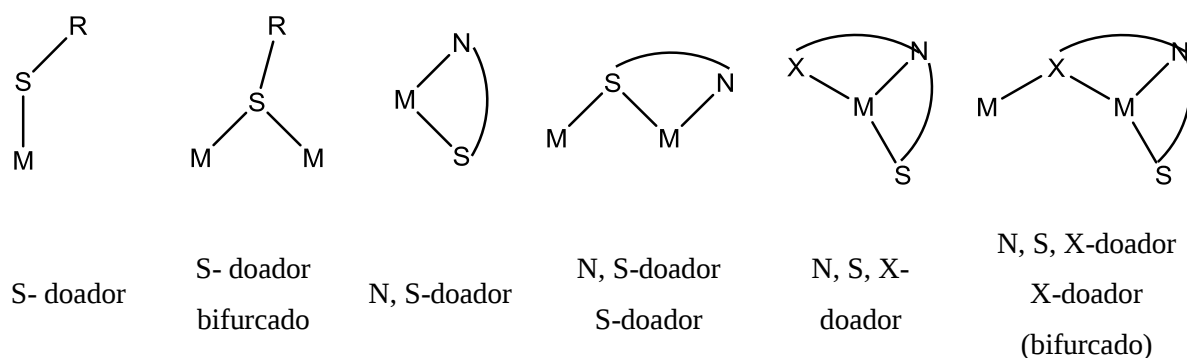


Figura 10 - Representação dos tipos de coordenação que as tiossemicarbazonas podem adquirir

Fonte: Adaptada Thomazella.

Para melhor compreensão na interpretação dos resultados foi adotada uma numeração para as tiossemicarbazonas³⁰, como ilustra a **Figura 11**. Os ligantes selecionados para o trabalho foram 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído-4-tiossemicarbazona (VATSC), 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído-4-metiltiossemicarbazona (VAMTSC), 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído-4-etiltiossemicarbazona (VAETSC), 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído-4-feniltiossemicarbazona (VAPTSC) e 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído-4-fenilsemicarbazona (VAPSCO) que se encontram no **Quadro 1**.

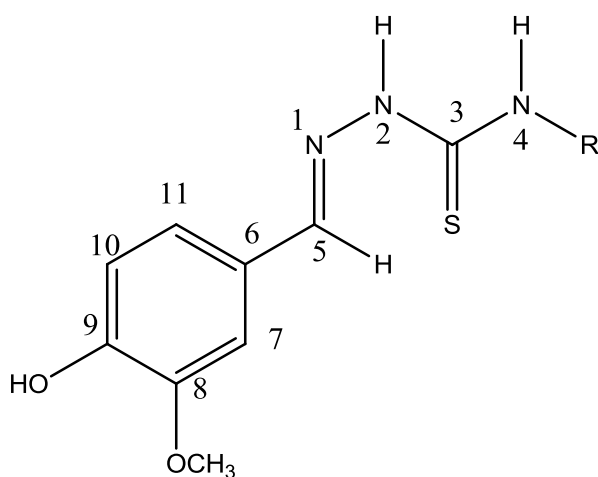
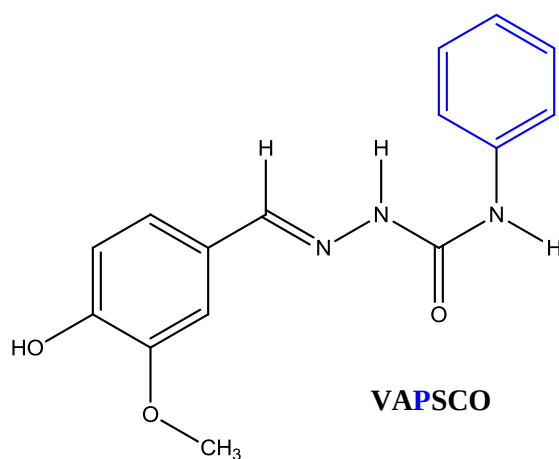
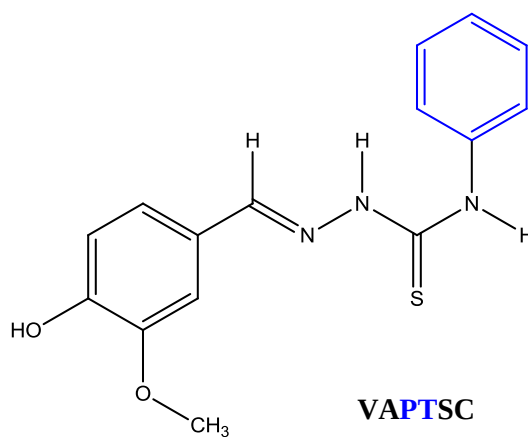
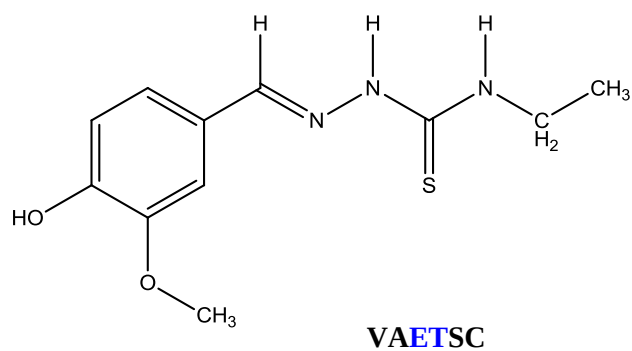
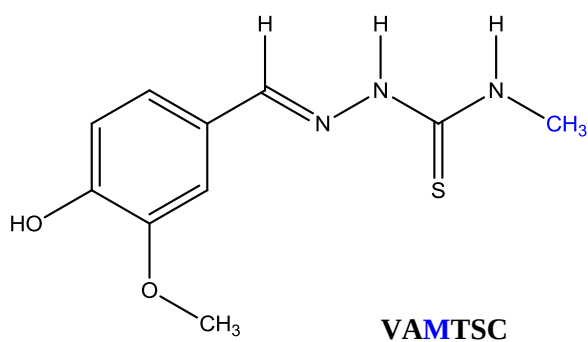
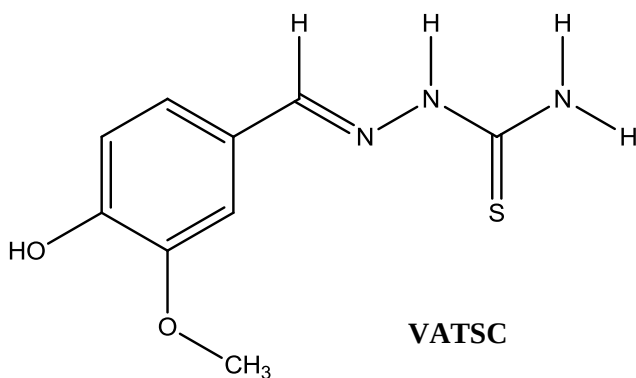


Figura 11 - Numeração proposta para os ligantes de tiossemicarbazona (TSC)

Quadro 1 - Ligantes utilizados



Espera-se que o complexo precursor (dinitrosilo de ferro) reaja com o respectivo ligante de forma a manter preferencialmente os grupos nitrosilo (NO) e liberar os grupos carbonila (CO), uma vez que, o grupo NO é um ótimo π receptor^{40,44}. Ademais, de acordo com os tipos

de coordenação das tiossemicarbazonas, espera-se que ocorra a coordenação pelos átomos de S e N (1) permitindo que haja a sugestão da estrutura abaixo (**Figura 12**):

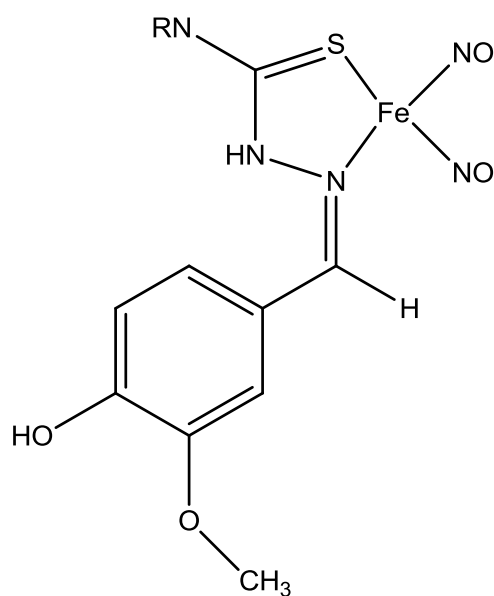


Figura 12 - Ilustração do complexo esperado

2. OBJETIVOS

Sintetizar e caracterizar os complexos de dinitrosilo de ferro contendo derivados vanilínicos de tiossemicarbazonas e semicarbazona e estudar o potencial biológico desses ligantes através de ensaios antibacterianos e citotóxico.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar os ligantes;
- Sintetizar o complexo precursor $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{CO})_2$;
- Sintetizar e caracterizar os complexos dinitrosilos de ferro contendo ligantes orgânicos - $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{L})_2$;
- Avaliar a capacidade inibitória dos ligantes frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e as células MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental para a preparação do complexo precursor - dinitrosilo de ferro - foi realizado em duas etapas, ambas em atmosfera inerte.

Os ligantes utilizados para a formação dos complexos foram feitos pelo grupo do Professor Adriano Bof de Oliveira da Universidade Federal de Sergipe. Tais ligantes foram caracterizados por dados de análise elementar, de espectroscopia de UV, IV e RMN e MS. Ensaios citotóxicos foram realizados juntamente com o grupo do Professor Adelino V. G. Netto e os ensaios biológicos juntamente com o grupo do Professor Saulo Santerro Garrido, ambos docentes do Instituto de Química da UNESP Araraquara. Em sequência, foi realizada a síntese dos complexos, os quais, foram nomeados de acordo com os ligantes coordenados, resultando nas nomeações: $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VATSC})$, $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAMTSC})$, $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$, $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ e $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPSCO})$.

A seguir, estão indicadas as especificações dos equipamentos e os consumíveis utilizados no desenvolvimento desse estudo.

3.1 Consumíveis

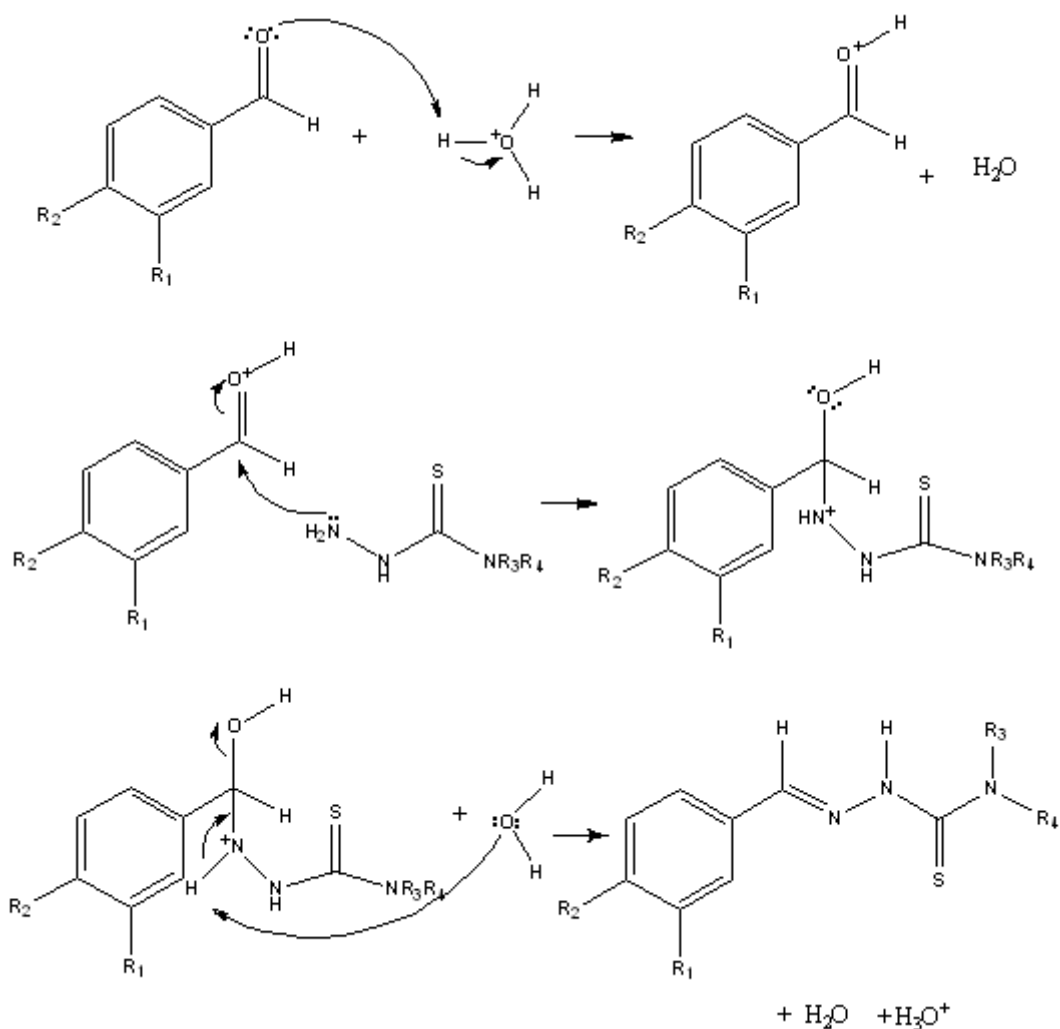
- Água destilada;
- Pentacarbonil de ferro - Marca: Sigma-Aldrich, > 99,99%, Lote #SHBC3293V;
- Nitrito de sódio PA - Marca: INLAB, Lote A-0621;
- Hidróxido de sódio PA - Marca: Synth, 97,0%, Lote 174206;
- Ácido acético glacial PA - Marca: Merck;
- Tetrahidrofurano - Marca: PanReac Applichen, 99,5%, Lote 0000956326;
- Metanol - Marca: NEON Comercial LTDA, 99,8%, Lote 42935;
- DMSO - Marca: Mallinckrodt Chemicals, 99,9%, Lote B24H34;
- DMSO -D6 - Marca: Cambridge Isotope Laboratories LTDA, 99,9% D;
- CDCL₃ - Marca: Aldrich, 99,8% D, Lote #STBH0191;
- Gás nitrogênio;
- Gás argônio.

3.2 Equipamentos

- Agitador magnético GoStirrer MS-H-Pro;
- Refrigerador Tecnal TE-184;
- Aparelho de Ponto de Fusão MicroQuímica modelo MOAPF - 301;
- Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com Raman acoplado Bruker com faixa de leitura – 400 a 4000 cm^{-1} e lente ATR (cristal de diamante);
- Espectrofotômetro de absorção na região do UV /Vis / NIR com esfera integradora, Lambda 1050 da Perkin Elmer com faixa de leitura de 200 a 800 nm;
- Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP AB Sciex. As amostras foram analisadas em solução H_2O : MeOH 1:1 com 0,1% de ácido fórmico. Ionização por eletrospray (ESI), modo positivo, voltagem do conjunto do capilar em 5500 v, circuito de gás / pressão do nebulizador a 12 psi e energia de colisão de 25 v;
- Espectrômetro RMN Bruker Avance III HD 600 (14,1 T) equipado com criossonda de 5 mm com detecção inversa;
- Espectrômetro de EPR Bruker EMX Plus banda X com frequência de 9,77 GHz, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 4G, potência de microondas de 6,33 mW, constante de tempo de 81,92 ms e número de scans igual a 8.

3.3 Síntese de tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas podem ser sintetizadas por condensação equimolar de um derivado carbonilado, como cetona ou aldeído, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido, sendo essa reação conhecida por alta quimiosseletividade, rapidez e bom rendimento. Abaixo, demonstra-se o mecanismo de formação de tiossemicarbazonas a partir da protonação do oxigênio da carbonila para formação do intermediário íon oxônio e, posterior, adição nucleofílica do nitrogênio (N-1) da tiossemicarbazida, que ao perder uma molécula de água, forma, por fim, a tiossemicarbazona³⁰.



3.4 Síntese do complexo precursor: dinitrosilo de ferro (DNIC)

A síntese do dinitrosilo de ferro (DNIC) envolveu duas etapas: primeiramente um sistema de refluxo e em seguida o gotejamento de ácido acético.

Para o início da síntese foram pesados 6 gramas de nitrito de sódio ($NaNO_2$) e 10 gramas de hidróxido de sódio ($NaOH$) que, juntamente, com 75 mL de água destilada, formaram uma solução a qual foi transferida para um balão de fundo redondo tritubulado de 250 mL sob atmosfera inerte de nitrogênio. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de pentacarbonil de ferro ($Fe(CO)_5$) ao balão de reação, que permaneceu sob agitação magnética constante, a temperatura de 150 °C para alcançar o refluxo registrado em 93 °C. O sistema permaneceu em refluxo por cerca de 3 horas e com a apresentação de uma coloração marrom escura. O aquecimento foi desligado a fim de resfriar a solução e o sistema de refluxo desmontado.

Para a segunda etapa o condensador de refluxo foi substituído por uma bureta, com sistema para alívio de pressão, contendo 100 mL de uma solução gelada de ácido acético glacial e água - $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1) - que ao ser gotejada lentamente na solução com o pentacarbonil de ferro provocou a mudança de coloração para um vermelho intenso característico da formação do dinitrosilo de ferro (DNIC) - $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{CO})_2]$.³¹ O vapor de DNIC formado percorreu o circuito montado e foi condensado em um tubo em U imerso em água a 8,5 - 9,0 °C. Um fluxo de nitrogênio gasoso foi utilizado e conduziu o produto em fase gasosa para ser condensado no tubo em U. O complexo obtido, de coloração vermelha intensa, foi transferido para um frasco e armazenado em congelador. Para melhor compreensão, as reações foram representadas abaixo, juntamente, com a montagem que se encontra na **Figura 13**:

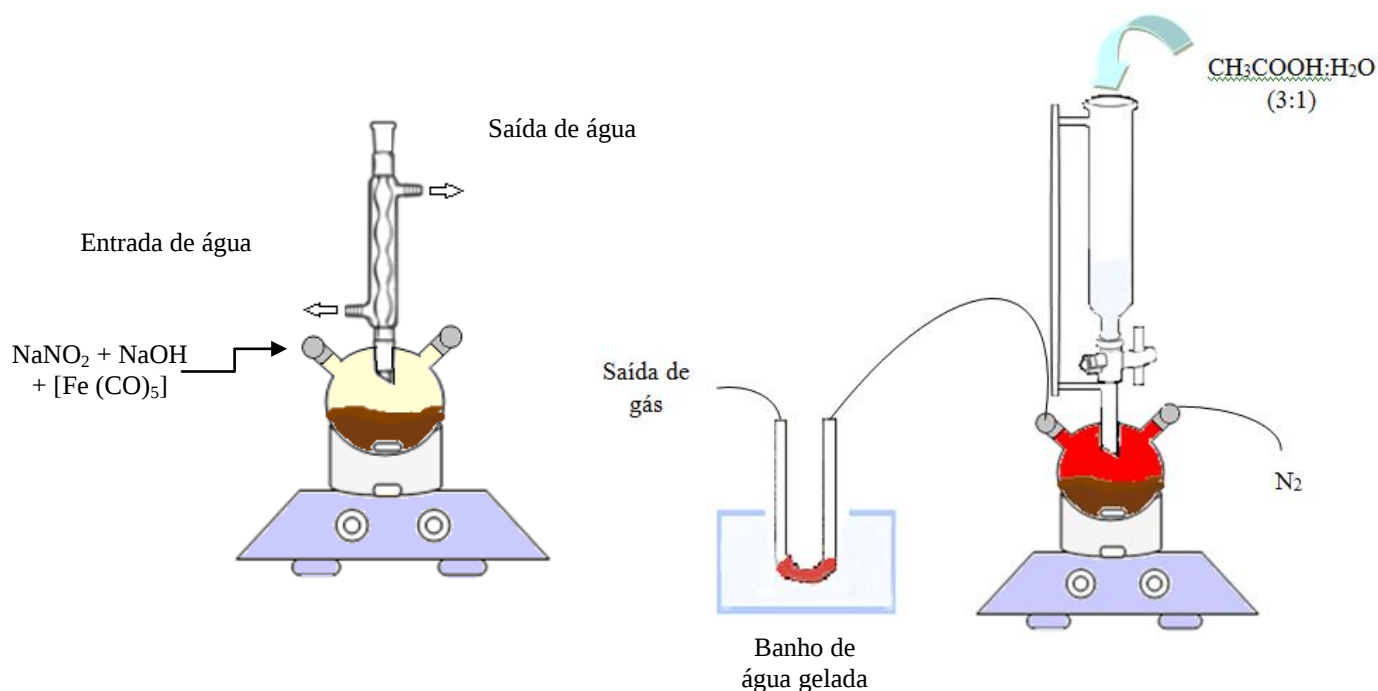
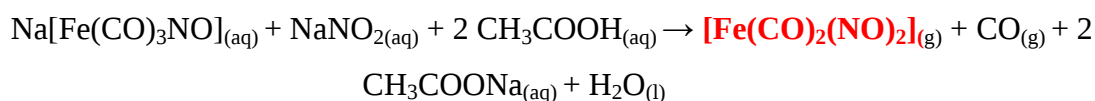
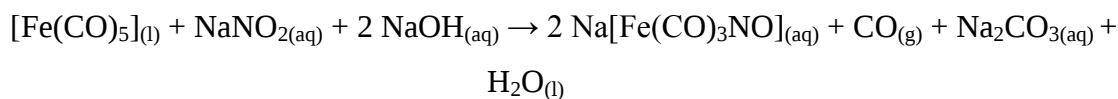


Figura 13 - Ilustração do sistema de refluxo da síntese de complexo precursor.

3.5 Síntese dos complexos

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 10 mL de THF e quantidade equimolar do ligante a ser utilizado, correspondente a 15 μ L do DNIC produzido, permanecendo em constante agitação por 30 minutos - tempo definido a partir de um acompanhamento por infravermelho durante 120 minutos da síntese do complexo feito a partir do ligante VAMTSC - em atmosfera inerte através de argônio. A adição do dinitrosilo de ferro à solução contendo o ligante orgânico induziu a rápida formação de um produto de coloração marrom. Cada solução resultante foi transferida para um bquer e permaneceu em repouso para evaporação lenta do THF.

3.6 Ensaios biológicos

3.6.1 Ensaio citotóxico

A citotoxicidade dos ligantes foi avaliada frente à linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano). As células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L), incubadas à 37°C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Uma concentração de 1×10^5 células/mL foi semeada em microplacas de 96 orifícios, com volume final de 100 μ L, incubada por 24h a 37°C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular. Os compostos foram aplicados às placas com tempo de tratamento de 48h. Após o período de tratamento foram adicionados 100 μ L de uma solução de MTT 1 mg/mL em PBS, e depois de 3h o conteúdo da placa foi removido e 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados em cada orifício para solubilizar os cristais formados. A leitura da absorbância foi realizada no leitor ELISA Stat Fax 4200. O valor de IC₅₀ foi determinado utilizando as curvas de dose-resposta no GraphPad Prism.

3.6.1 Padronização das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus* (14458) e *Escherichia coli* enterohemorrágica 07H157 (43895) foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em meio de cultura Muller Hinton (CMH), adicionando-se meio de cultura estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual, foi utilizada nos ensaios.

3.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita, segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute.³² Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 80 µL de meio de cultura (CMH). Em seguida, foram acrescentados 100 µL do analito previamente solubilizado em solução de DMSO (5%) e realizada a diluição seriada. Adicionalmente, foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a ciprofloxacina em concentração adequada para cada micro-organismo, visando alcançar a CIM. Também foram realizados o controle do meio de cultura e o controle de crescimento bacteriano. As microplacas foram encubadas em estufa microbiológica à temperatura de 37° C durante 24 horas. Posteriormente, foram realizadas leituras em leitor de microplaca Epoch em 595 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo espectroscópico dos ligantes VATSC, VAMTSC, VAETSC, VAPSCO e VAPTSC serviu de base para o estudo dos complexos a serem formados, sendo realizadas as técnicas de Análise Elementar, UV-Vis, Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear. Os complexos formados foram analisados por Infravermelho, UV-Vis, Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear e Ressonância Paramagnética Eletrônica.

4.1 Ligantes

4.1.1 Análise Elementar

A análise elementar (C,H,N) dos ligantes mostrou valores experimentais próximos aos valores calculados (**Tabela 1**), auxiliando na confirmação da fórmula molecular.

Tabela 1 - Resultados da análise elementar de (C,H,N) para os ligantes; valores experimentais (VE), valores calculados (VC) e erro.

Ligantes	% C			% H			% N		
	VE	VC	Erro	VE	VC	Erro	VE	VC	Erro
VATSC	48,06	47,99	0,15	4,98	4,92	1,22	18,65	18,64	0,05
VAMTSC	50,75	50,19	1,12	5,54	5,48	1,09	17,74	17,56	1,03
VAETSC	52,19	52,15	0,08	5,92	5,99	1,17	16,62	17,59	5,51
VAPTSC	59,35	59,78	0,72	4,98	5,02	0,80	13,49	13,94	3,23
VAPSCO	63,10	63,15	0,08	5,35	5,30	0,94	14,66	14,73	0,48

4.1.2 Espectroscopia na região UV/Vis

Nos espectros de UV obtidos para os ligantes com tiossemicarbazona foram observadas bandas na faixa de 328 nm a 335 nm que correspondem a transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e / ou $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo tioamida³³. Bandas no intervalo de 293 nm a 304 nm foram atribuídas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de C=N e em torno de 230 nm a excitação de elétrons dos aromáticos.³⁴ Além dessas, transições $n \rightarrow \pi^*$ de cromóforos C=N ocorrem na faixa de 250 a 360 nm.³⁵ Para o ligante VAPSCO foi atribuída a banda em 282 nm a transição $n \rightarrow \pi^*$ de C=O.³⁵

Os espectros obtidos na região do UV-Vis encontram-se abaixo:

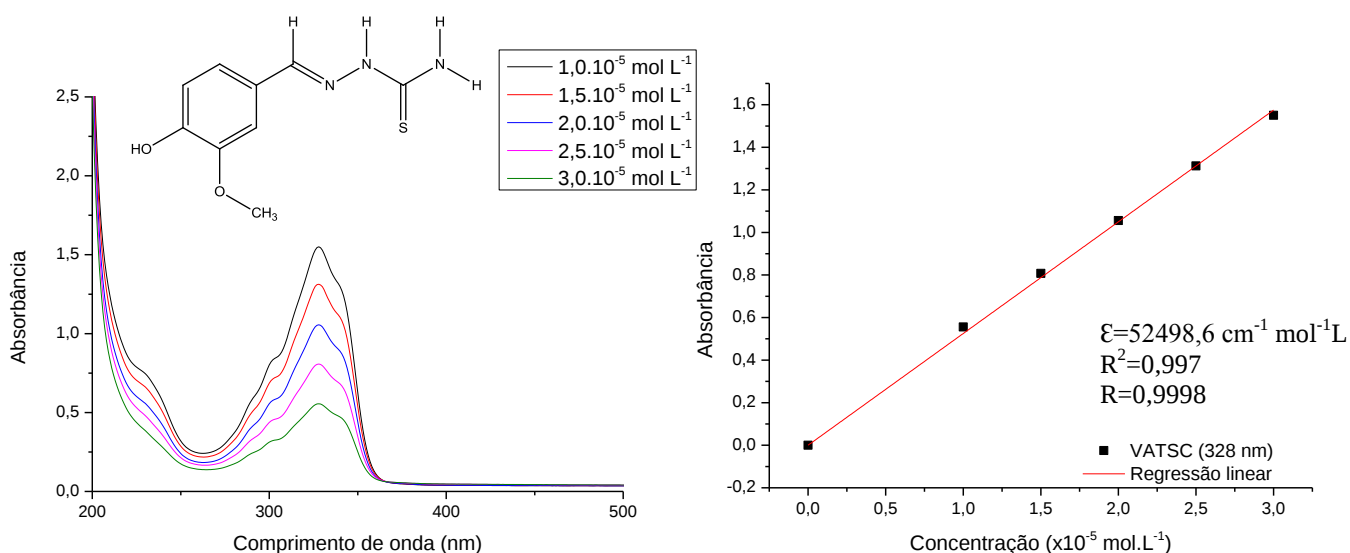


Figura 14 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VATSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm(b).

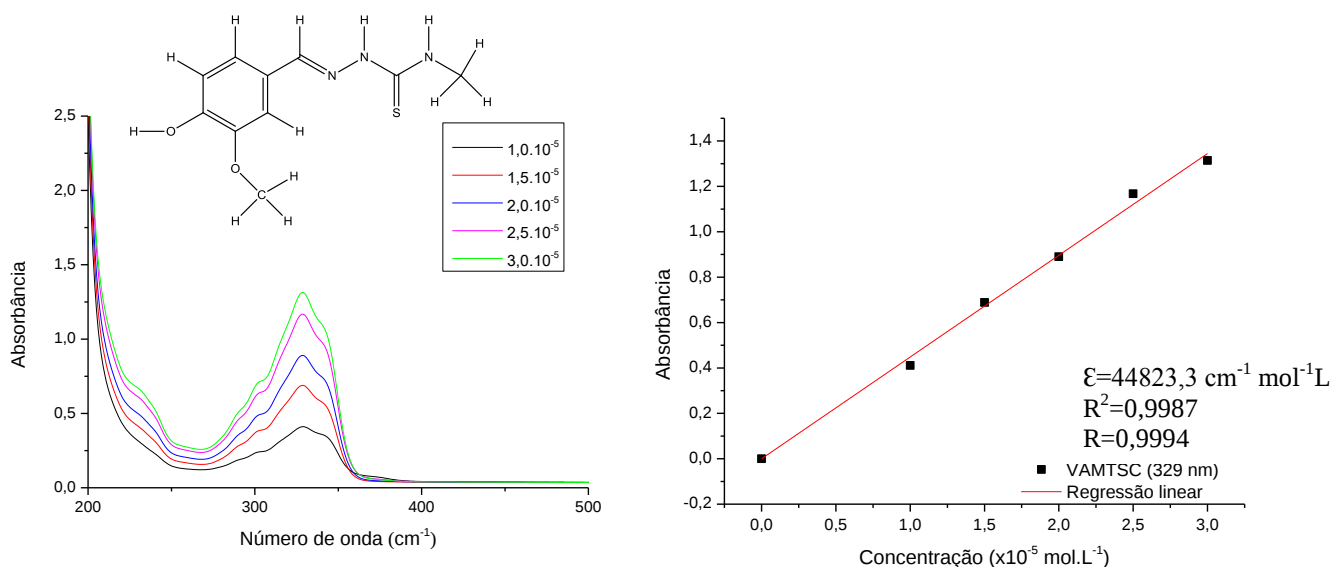


Figura 15 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAMTSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm (b).

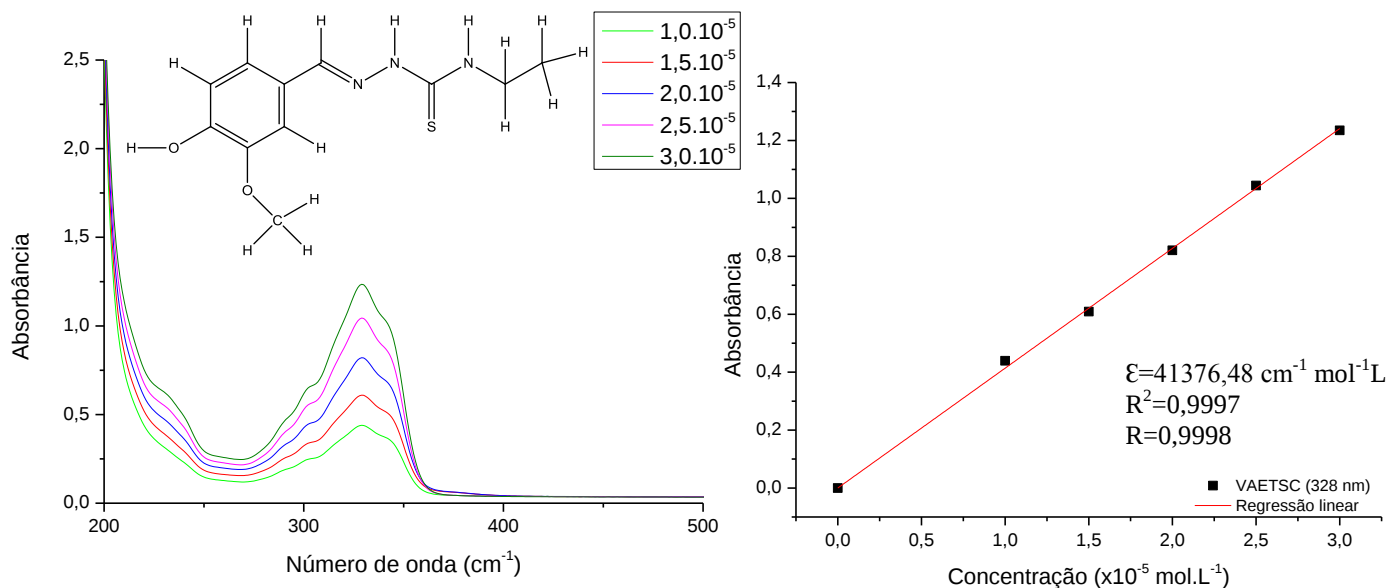


Figura 16 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAETSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm (b).

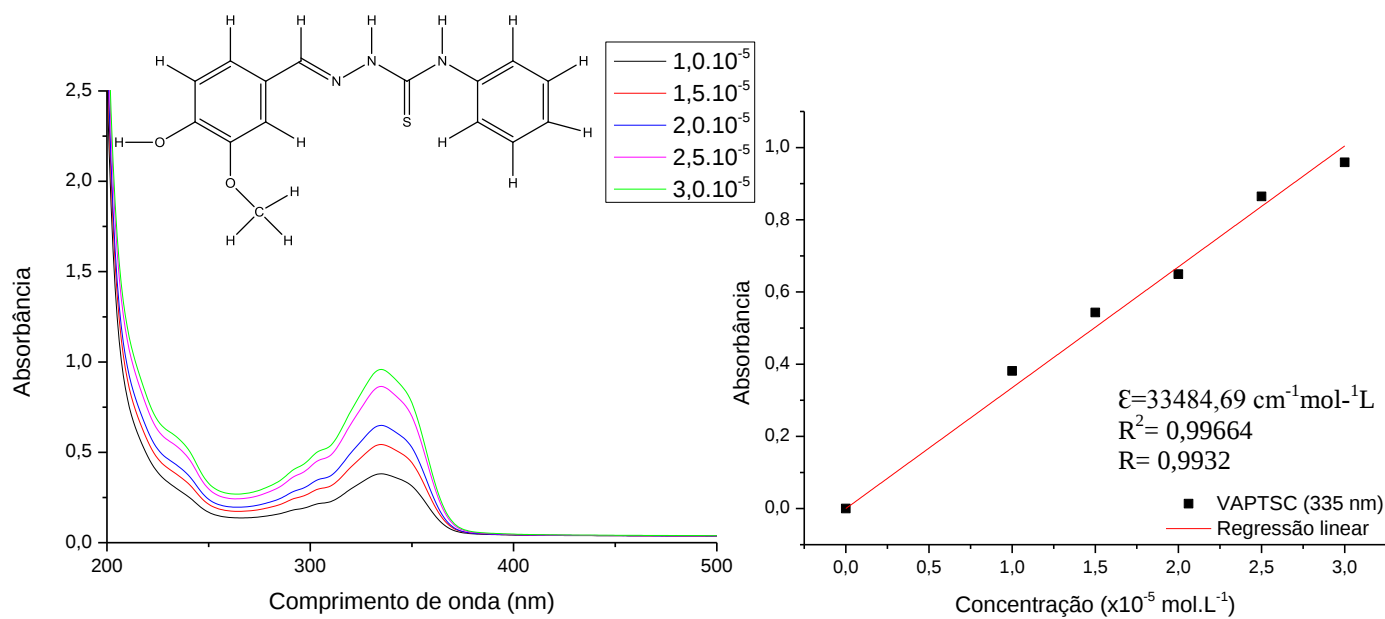


Figura 17 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAPTSC (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 335 nm (b).

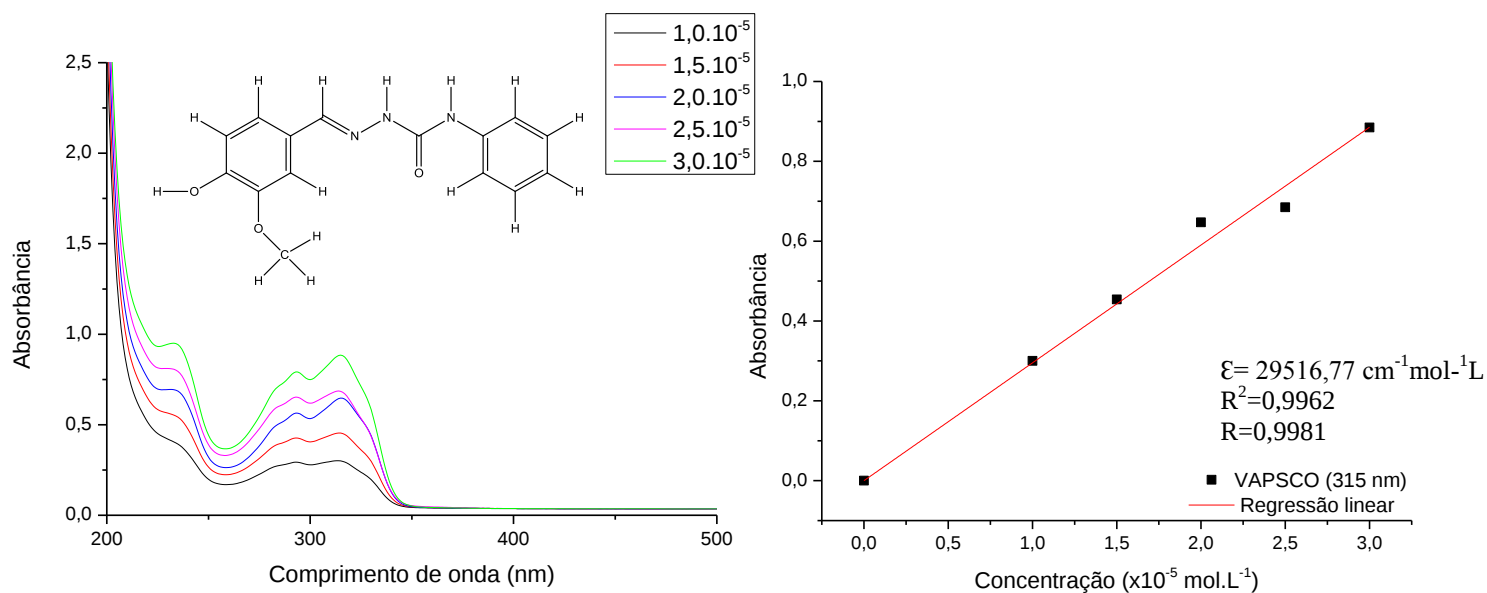


Figura 18 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de VAPSCO (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 315 nm (b).

Tabela 2 – Valores de absorção e absortividade molar em UV-Vis para VATSC, VAMTSC, VAETSC, VAPTSC e VAPSCO.

Ligante	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$)
VATSC	340, 328, 302, 290, 230	52498,6 (328 nm)
VAMTSC	341, 329, 301, 288, 234	44823,3 (329 nm)
VAETSC	342, 328, 301, 289, 231	41376,5 (328 nm)
VAPTSC	335, 304, 291, 238	33484,7 (335 nm)
VAPSCO	315, 293, 282, 233	29516,8 (315 nm)

4.1.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes VATSC, VAMTSC, VAETSC e VAPTSC, (**Figura 19**), obtidos em estado sólido, apresentaram absorções no intervalo de aproximadamente 3157 cm^{-1} a 3527 cm^{-1} que sugerem a presença de estiramento NH. Observaram-se também absorções em torno de 1500 cm^{-1} que sugerem a presença de tioamida I ($\delta\text{NH} + \delta\text{CH} + \nu(\text{C}=\text{N})$); entre $1200 - 1300\text{ cm}^{-1}$ as bandas sugerem a presença de tioamida II ($\delta\text{NH} + \delta\text{CH} + \nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{S})$); em torno de 1000 cm^{-1} o grupo tioamida III ($(\nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{S}))$) e na faixa de $700 - 850$ o grupo tioamida IV ($\nu(\text{C}=\text{S})$)³⁶. A ausência de bandas no intervalo de 2600 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} indica que o estiramento da forma tiol ($\nu\text{ S-H}$) é menos favorecido quando comparado ao da forma ($\nu\text{ C}=\text{S}$), sendo ambas as formas tautoméricas para as tiossemicarbazonas (**Figura 20**). Absorções encontradas entre $1100 - 1300$ sugerem o estiramento C-O, que pode estar justaposto as absorções do grupo tioamida, enquanto absorções entre $1475 - 1600\text{ cm}^{-1}$ sugerem a presença de C=C de aromáticos³⁵. Já o ligante VAPSCO, com espectro obtido em forma sólida, apresentou absorção em 3354 cm^{-1} que sugere a presença de estiramento NH. Observaram-se também absorções em 1670 cm^{-1} característica de estiramento C=O, em $1588,12\text{ cm}^{-1}$ sugere-se estiramento C=N e em 1280 cm^{-1} estiramento C-O.

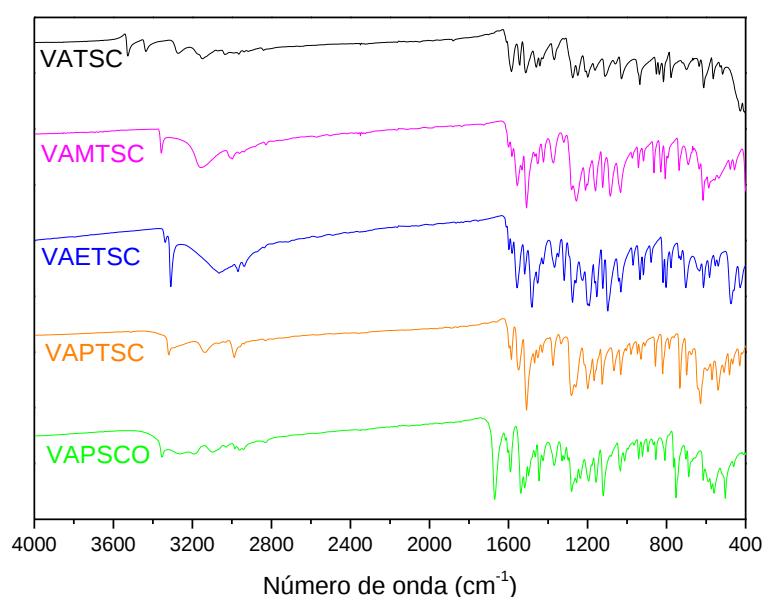


Figura 19 - Espectros dos ligantes na região do Infravermelho

Abaixo na **Tabela 3** encontram-se as principais atribuições dadas a cada ligante:

Tabela 3 - Principais atribuições de cada ligante na Espectroscopia na região do Infravermelho

Ligante	Número de onda (cm ⁻¹)				
	$\nu(\text{NH})$	Tioamida I	Tioamida II	Tioamida III	Tioamida IV
VATSC	3527,06	1544,77; 1514,11	1275,73	1029,05	836,86; 815,13
VAMTSC	3358,56	1556,48; 1531,73	1282,39	1033,41	829,29; 807,46
VAETSC	3309,96	1557,68; 1517,61	1277,14	1031,72	818,91; 802,80
VAPTSC	3318,98	1549,48; 1508,20	1283,31	1032,61	856,75; 819,78
VAPSCO	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C-O})$
	3353,47	1670,07	1588,12	1444,14	1280,08

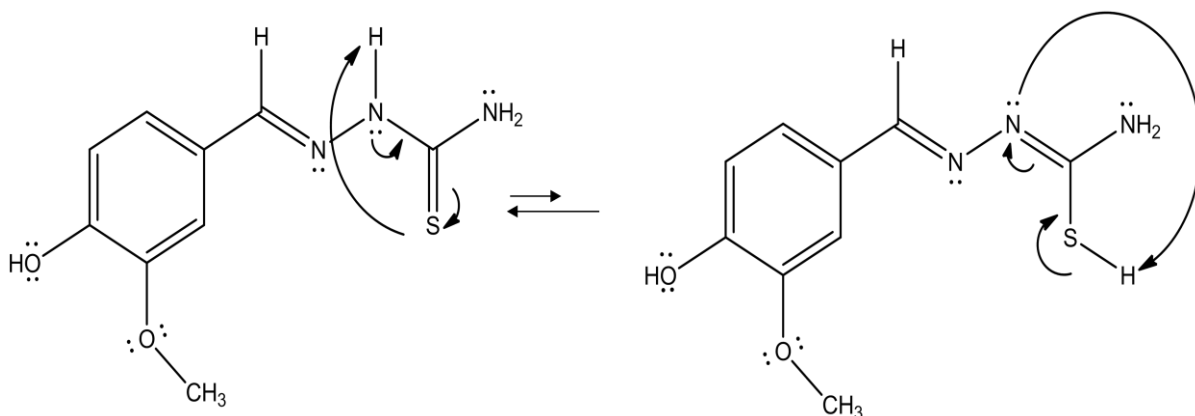


Figura 20 - Formas tautoméricas possíveis para as tiossemicarbazonas

4.1.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de RMN de ^1H do ligante VATSC (**Figura 21**) está de acordo com o esperado, pois apresentou três sinais na região dos hidrogênios aromáticos, sendo atribuídos um duplete em δ 6,77 com constante de acoplamento equivalente a 8,1 Hz, um duplo duplete em δ 7,03 ($J = 8,1$ e $1,9$ Hz) e um duplete em δ 7,47 com $J = 1,9$ Hz. Foi observado um simpleto em δ 11,26, referente, ao hidrogênio da ligação N-H de número (2). Um simpleto em δ 3,82, correspondente, aos hidrogênios presentes em O - CH₃ e dois simpletos em δ 8,11 e δ 7,95 se referem aos hidrogênios do grupo NH₂ que não se comportam como um único simpleto, devido à conformação da molécula e a rotação da ligação³⁰. Os sinais em δ 9,47 e em δ 7,92 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das ligações CH=N e O-H.

O experimento de RMN de ^{13}C (**Figura 22**) apresentou um espectro com 9 sinais de carbono: seis sinais relativos a carbonos de anel aromático, onde três são metínicos (δ 109,24; 115,20; 122,40) e três quaternários (δ 125,61; 148,12; 148,82) correspondem, respectivamente, ao carbono de número 6 (C₆), ao carbono ligado ao grupo metoxila e, por fim, a hidroxila. Outros sinais de C (δ 55,76; 142,90; 177,38), referem-se, respectivamente, a metila, ao carbono de número 5 (C₅) e ao carbono da ligação C=S (**Tabela 4**). Atenta-se para a presença de sinais relativos ao solvente DMSO.d6 e a água como contaminante do solvente em todos os espectros de RMN de ^1H com sinal em δ 2,50 pertencente ao DMSO.d6 e a água em δ 3,39. Nos espectros DEPT o deslocamento químico do solvente equivale a δ 39, 52.

Tabela 4 - Dados de RMN 1D de VATSC.

Nº átomo	VATSC	
	δ_H^a , nº H, Mult, <i>J</i> (Hz)	δ_C
1		
2	11,26 (1H; s)	-
3		177,38
4	8,11 (1H; s) e 7,95 (1H; s)	-
5	9,47 (1H; s)	142,90
6	-	125,61
7	7,47 (1H; <i>d</i> ; 1,9)	109,24
8	-	148,12
9	-	148,82
10	6,77 (1H; <i>d</i> ; 8,1)	115,20
11	7,03 (1H; <i>dd</i> ; 1,9 e 8,1)	122,40
12	3,82 (3H; s)	55,76
13	7,92 (1H; s)	-

^aEspectros obtidos em DMSO-d₆, 600/150MHz.

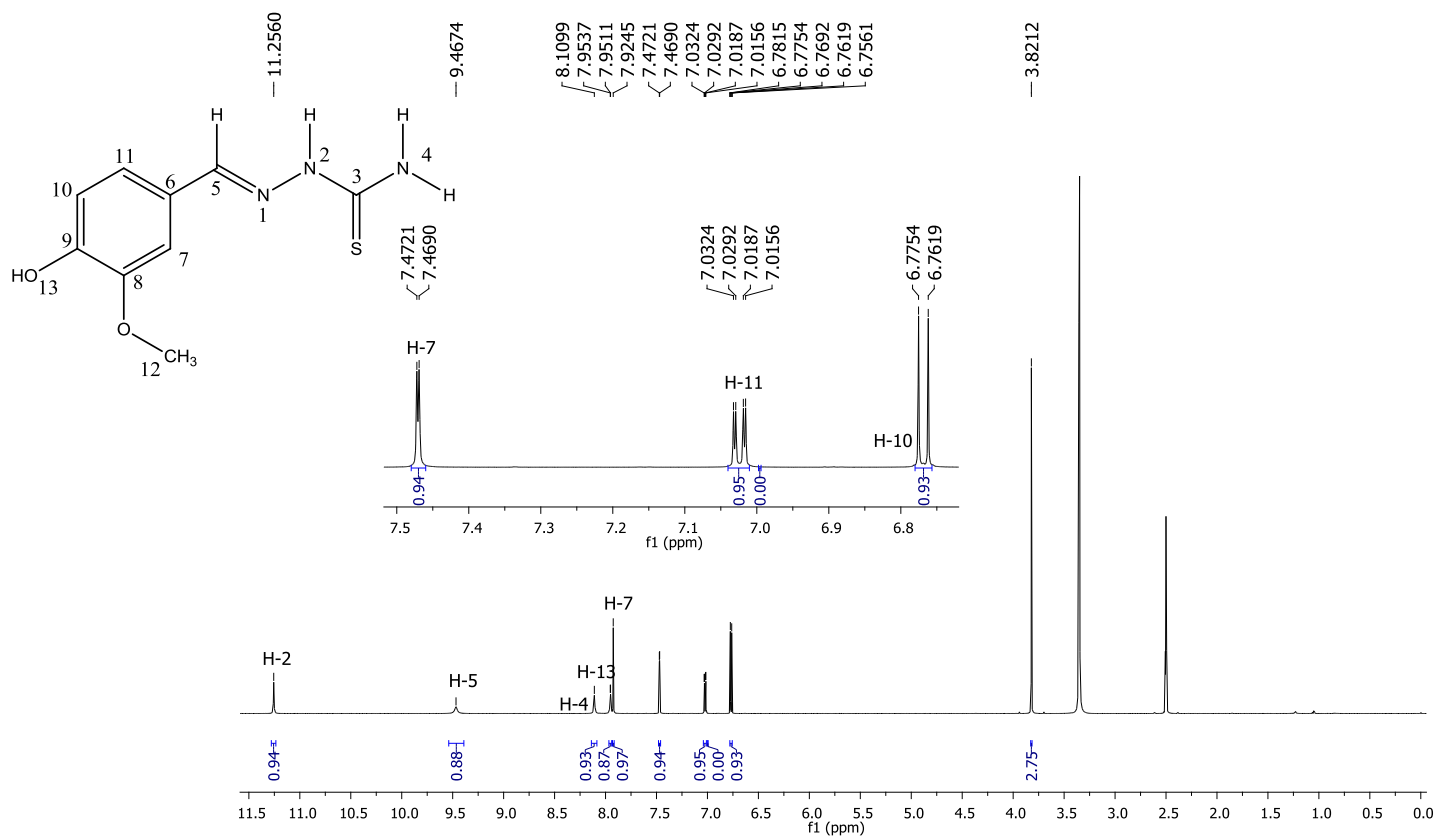


Figura 21 - Espectro de RMN de ¹H de VATSC (DMSO.d₆, 600MHz).

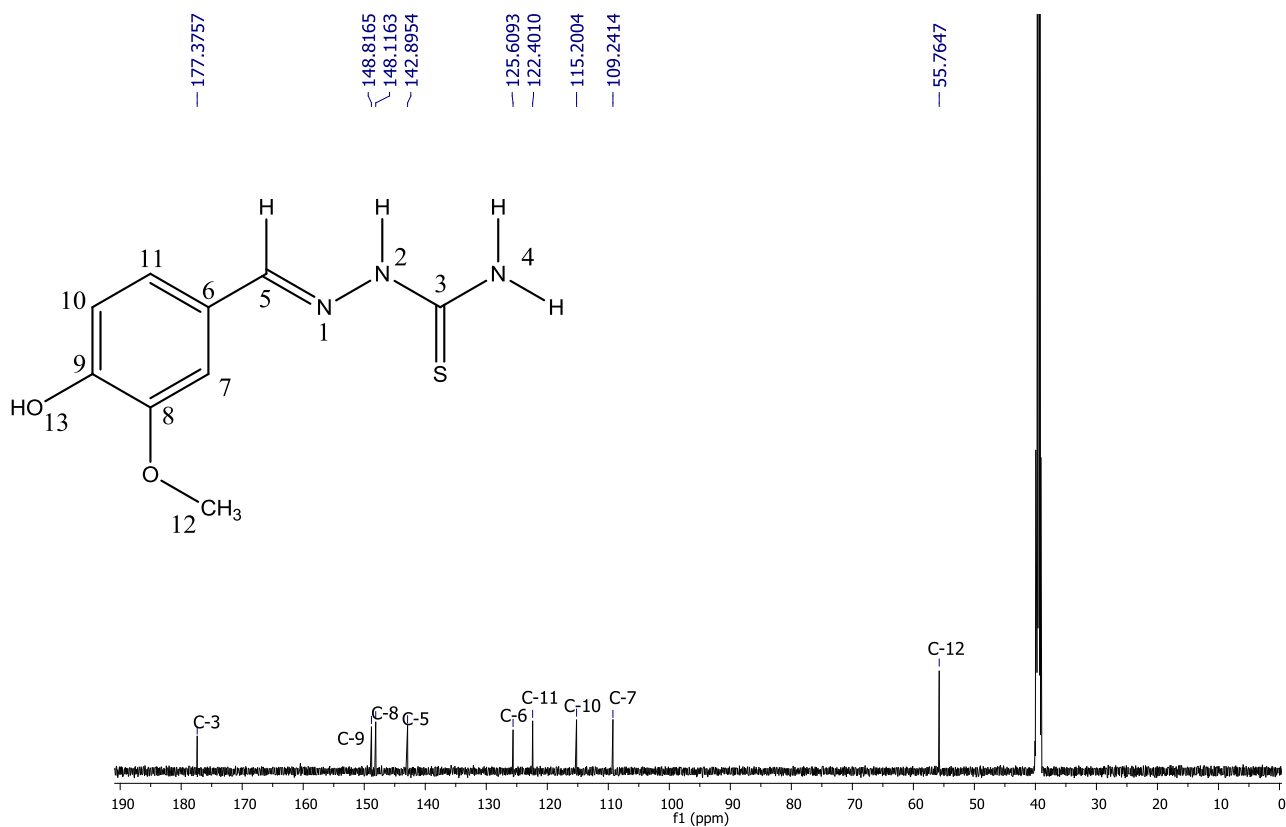


Figura 22 - Espectro de RMN de ¹³C de VATSC (DMSO.d₆, 150 MHz)

O espectro de RMN de ^1H do ligante VAMTSC (**Figura 23**) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um duplete em δ 6,79 com constante de acoplamento equivalente a 8,1 Hz, um duplo duplete em δ 7,10 ($J = 8,1$ e 1,9 Hz) e um duplete em δ 7,40 com $J = 1,9$ Hz. Foram observados ainda, um simpleto em δ 11,32 referente ao hidrogênio ligado ao N (4) e um quarteto em δ 8,37 referente aos hidrogênios de CH_2 como parte do grupo R. Um simpleto em δ 3,83 corresponde aos hidrogênios presentes em O - CH_3 . Os sinais em δ 9,47 e em δ 7,93 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das ligações $\text{CH}=\text{N}$ e O-H. O duplete em δ 3,02 refere-se aos hidrogênios da metila (H -14).

Com o experimento de RMN de ^{13}C (**Figura 24**) foi possível listar sinais de carbono e atribuí-los como: seis sinais relativos a carbonos de anel aromático, onde três são metínicos (δ 109,81; 115,37; 121,98) e três sinais (δ 125,66; 148,04; 148,77) que correspondem, respectivamente, ao C_6 , ao carbono ligado ao grupo metoxila e, por fim, a hidroxila. Outros sinais de C (δ 31,27; 55,84; 142,47; 177,36), referem-se respectivamente, a metila em (N-4), a metoxila, ao C_5 e ao carbono da ligação $\text{C}=\text{S}$ (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Dados de RMN 1D de VAMTSC.

Nº átomo	VAMTSC	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, Nº H, Mult, <i>J</i> (Hz)	δ_{C}
1		
2	11,32 (1H; s)	-
3		177,36
4	8,37 (1H; <i>dd</i> ; 4,6)	-
5	9,47 (1H; s)	142,47
6	-	125,66
7	7,40 (1H; <i>d</i> ; 1,9)	109,81
8	-	148,04
9	-	148,77
10	6,79 (1H; <i>d</i> ; 8,1)	115,37
11	7,10 (1H; <i>dd</i> ; 1,9 e 8,1)	121,98
12	3,83 (3H; s)	55,84
13	7,93 (1H; 1s)	-
14	3,02 (3H; <i>d</i> ; 4,6)	31,27

^aEspectros obtidos em DMSO.d6, 600/150MHz.

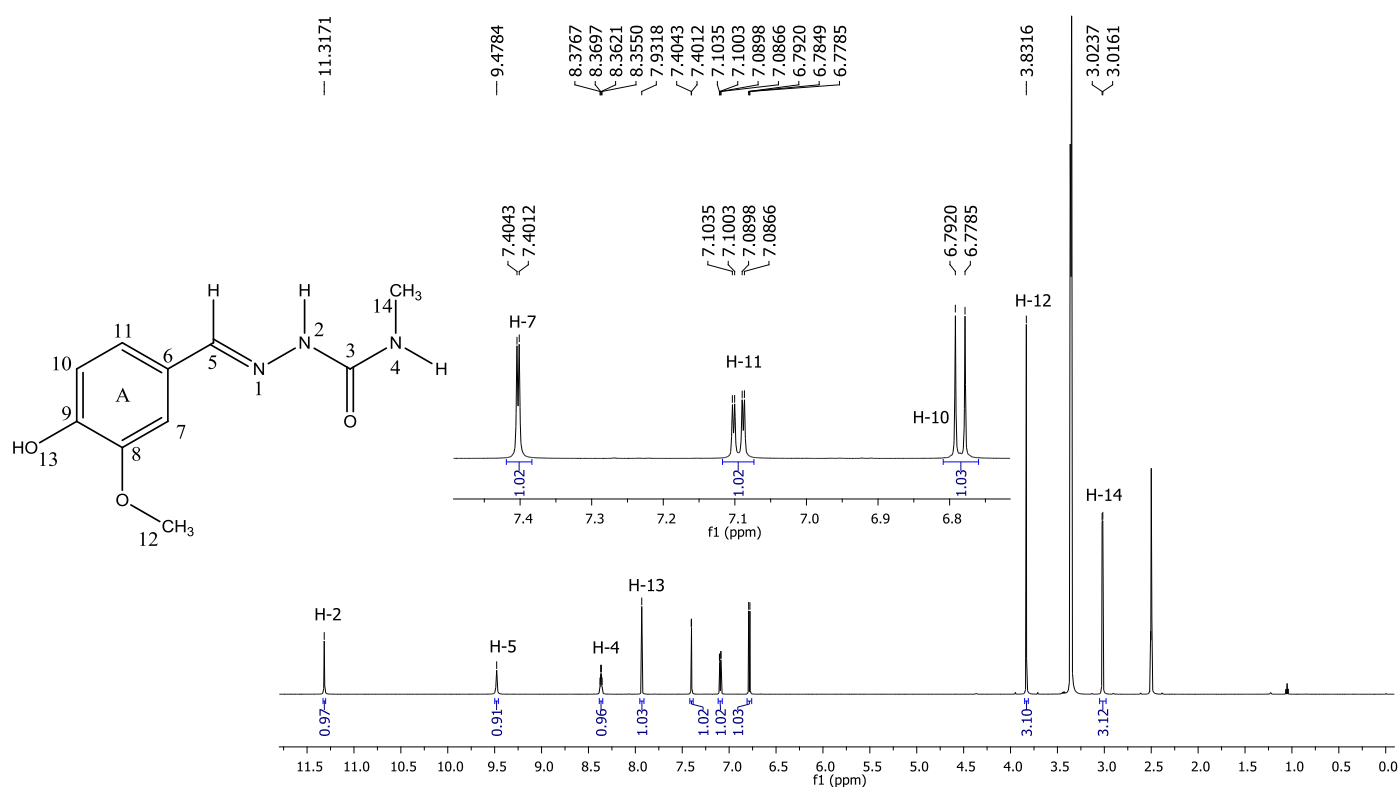


Figura 23 - Espectro de RMN de ¹H de VAMTSC (DMSO.d₆, 600 MHz).

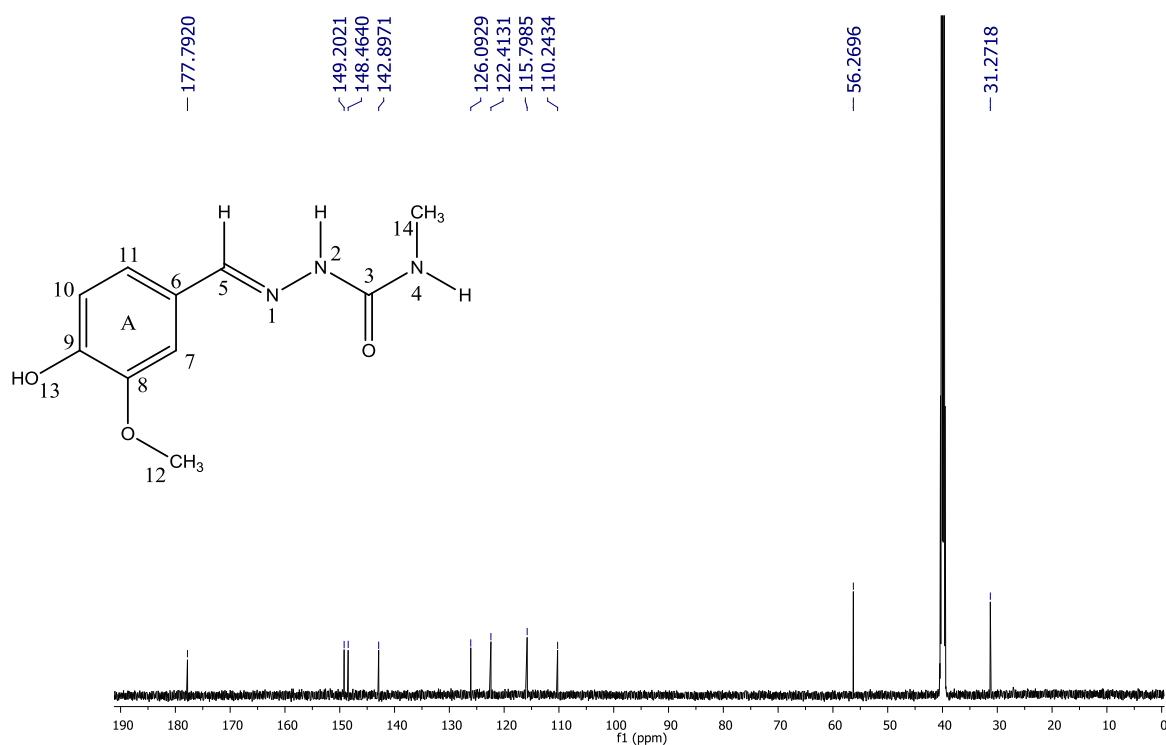


Figura 24 - Espectro de RMN de ¹³C de VAMTSC (DMSO.d₆, 150 MHz).

O espectro de RMN de ^1H de VAETSC (**Figura 25**) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um duplete em δ 6,79 com constante de acoplamento equivalente a 8,2 Hz, um duplo duplete em δ 7,13 ($J = 8,2$ e $1,9$ Hz) e um duplete em δ 7,37 com $J = 1,9$ Hz. Foi observado um simpleto em δ 11,26 referente ao hidrogênio da ligação N-H de número 2 e um tripleto em δ 8,39 referente ao hidrogênio de número 4. Os sinais em δ 9,49 e em δ 7,94 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das ligações CH=N e O-H. Um simpleto em δ 3,83 corresponde aos hidrogênios presentes em O - CH₃. O sinal em δ 3,59 corresponde aos hidrogênios metilênicos e o tripleto em δ 1,15 refere-se aos hidrogênios metílicos.

Com o experimento de RMN de ^{13}C (**Figura 26**) foi possível listar sinais de carbono e realizar as atribuições: seis sinais relativos a carbonos de anel aromático, onde três são metínicos (δ 110,12; 115,43; 121,86) e três sinais (δ 125,60; 147,98; 148,79) correspondem, respectivamente, ao C₆, ao carbono ligado ao grupo metoxila e, por fim, a hidroxila. Outros sinais de C (δ 14,78; 38,23; 55,87; 142,58; 176,31), referem-se, respectivamente, a metila, ao grupo CH₂, ao carbono do grupo metoxila, ao C₅ e ao carbono da ligação C=S (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Dados de RMN 1D de VAETSC.

Nº átomo	VAETSC	
	δ_H^a , Mult, <i>J</i> (Hz)	δ_C^a
1		
2	11,26 (1H; s)	-
3		176,31
4	8,39 (1H; <i>t</i> ; 5,9 Hz)	-
5	9,49 (1H; s)	142,58
6	-	122,60
7	7,37 (1H; <i>d</i> ; 1,9)	110,12
8	-	147,98
9	-	148,79
10	6,79 (1H; <i>d</i> ; 8,2)	115,43
11	7,13 (1H; <i>dd</i> ; 1,9 e 8,2)	121,86
12	3,83 (3H; s)	55,87
13	7,94 (1H; 1s)	-
14	3,59 (2H; <i>qd</i> ; 5,9 e 7,1)	38,23
15	1,15 (3H; <i>t</i> ; 7,1 e 5,9Hz)	14,78

^aEspectros obtidos em C₂D₆OS, 600/150MHz.

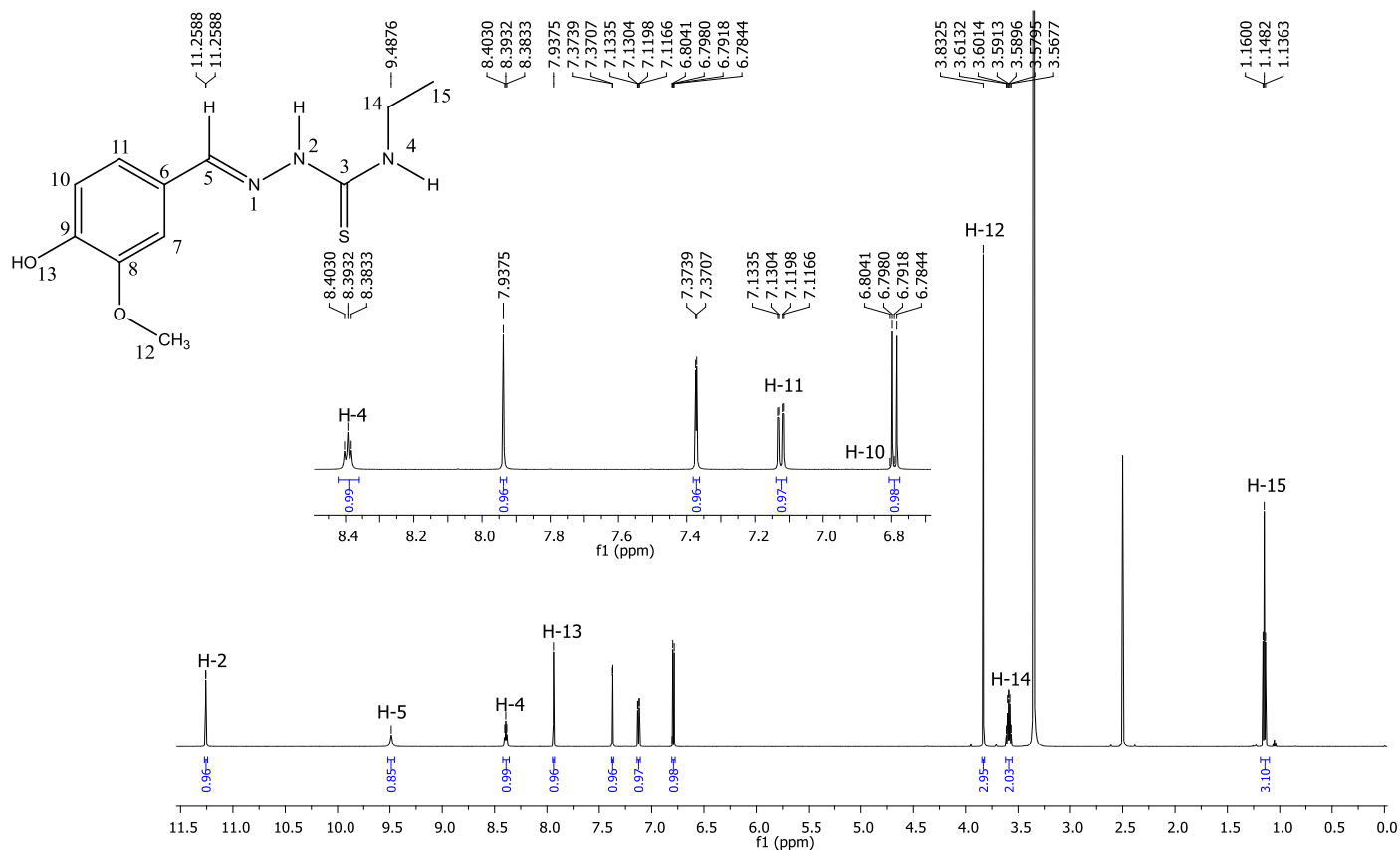


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H de VAETSC (DMSO.d₆, 600 MHz).

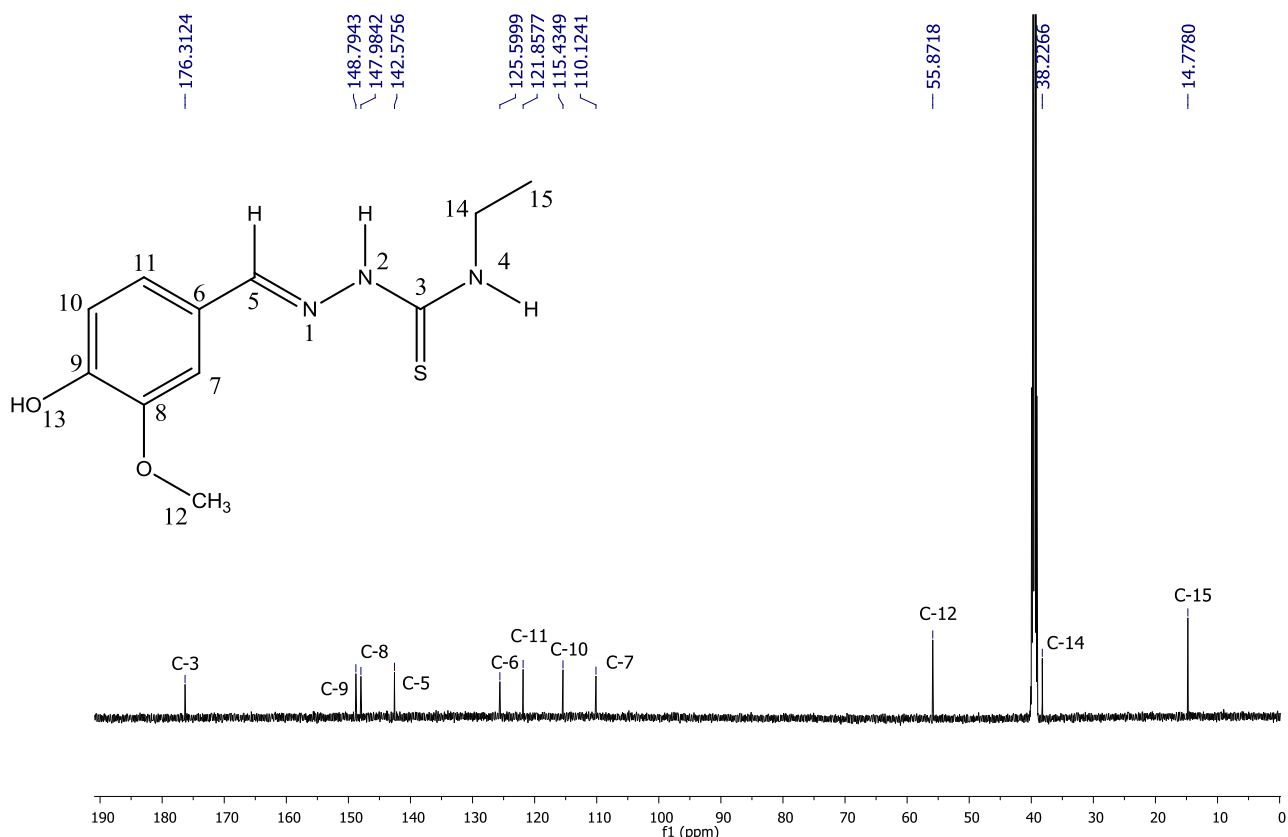


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C de VAETSC (DMSO.d₆, 150 MHz).

O espectro de RMN de ^1H de VAPTSC (**Figura 27**) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um duplete em δ 6,80 com constante de acoplamento equivalente a 8,1 Hz, um duplo duplete em δ 7,18 ($J = 8,1$ e $1,9$ Hz) e um duplete em δ 7,52 com $J = 1,9$ Hz. Foi observado um simpleto em δ 11,67, referente, ao hidrogênio da ligação N-H de número 2. Os sinais em δ 8,05 e em δ 9,56 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das ligações HC=N e O-H. O simpleto em δ 9,98 refere-se ao hidrogênio de NH de número 4. Um simpleto em δ 3,83 corresponde aos hidrogênios presentes em O - CH₃. Os hidrogênios aromáticos do segundo anel apresentaram-se de forma a sugerir H15 como o sinal de duplete em δ 7,55, H16 como um triplo triplete de sinal δ 7,36 e H17 como um triplo triplete em δ 7,20.

Com o auxílio dos experimentos de RMN de ^{13}C (**Figura 28**), HSQC (**Figura 29**) e HMBC (**Figura 26**) foi possível listar sinais de carbono e realizar as atribuições: doze sinais relativos a carbonos de anel aromático que serão nomeados, para facilitar a compreensão, como anéis A e B. No anel A três carbonos são metínicos (δ 110,47; 115,74; 123,05) e três quaternários (δ 125,73; 148,39; 149,19). No anel B cinco carbonos são metínicos (δ 126,48; 128,56; 125,85) sendo que o valor de δ 126,48 refere-se aos carbonos 15 e o valor de δ 128,56 aos carbonos 16. Outros sinais de C (δ 55,92; 142,58; 176,31), referem-se respectivamente, ao carbono do grupo metoxila, ao carbono de número 5 e ao carbono da ligação C=S (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Dados de RMN 1D e 2D de VAPTSC.

Nº átomo	VAPTSC	
	δ_H^a , nº H, Mult, <i>J</i> (Hz)	δ_C
1		
2	11,67 (1H; s)	-
3		175,55
4	9,98 (1H; s)	-
5	8,05 (1H; s)	144,22
6	-	125,73
7	7,52 (1H; <i>d</i> ; 1,9)	110,47
8	-	148,39
9	-	149,19
10	6,80 (1H; <i>d</i> ; 8,1)	115,74
11	7,18 (1H; <i>dd</i> ; 1,9 e 8,1)	123,05
12	3,83 (3H; s)	56,20
13	9,56 (1H; 1 <i>s</i>)	-
14	-	139,46
15	7,55 (2H; <i>d</i>)	126,48
16	7,36 (2H; <i>tt</i>)	128,56
17	7,20 (1H; <i>tt</i>)	125,85

^aEspectros obtidos em DMSO-*d*₆, 600/150MHz.

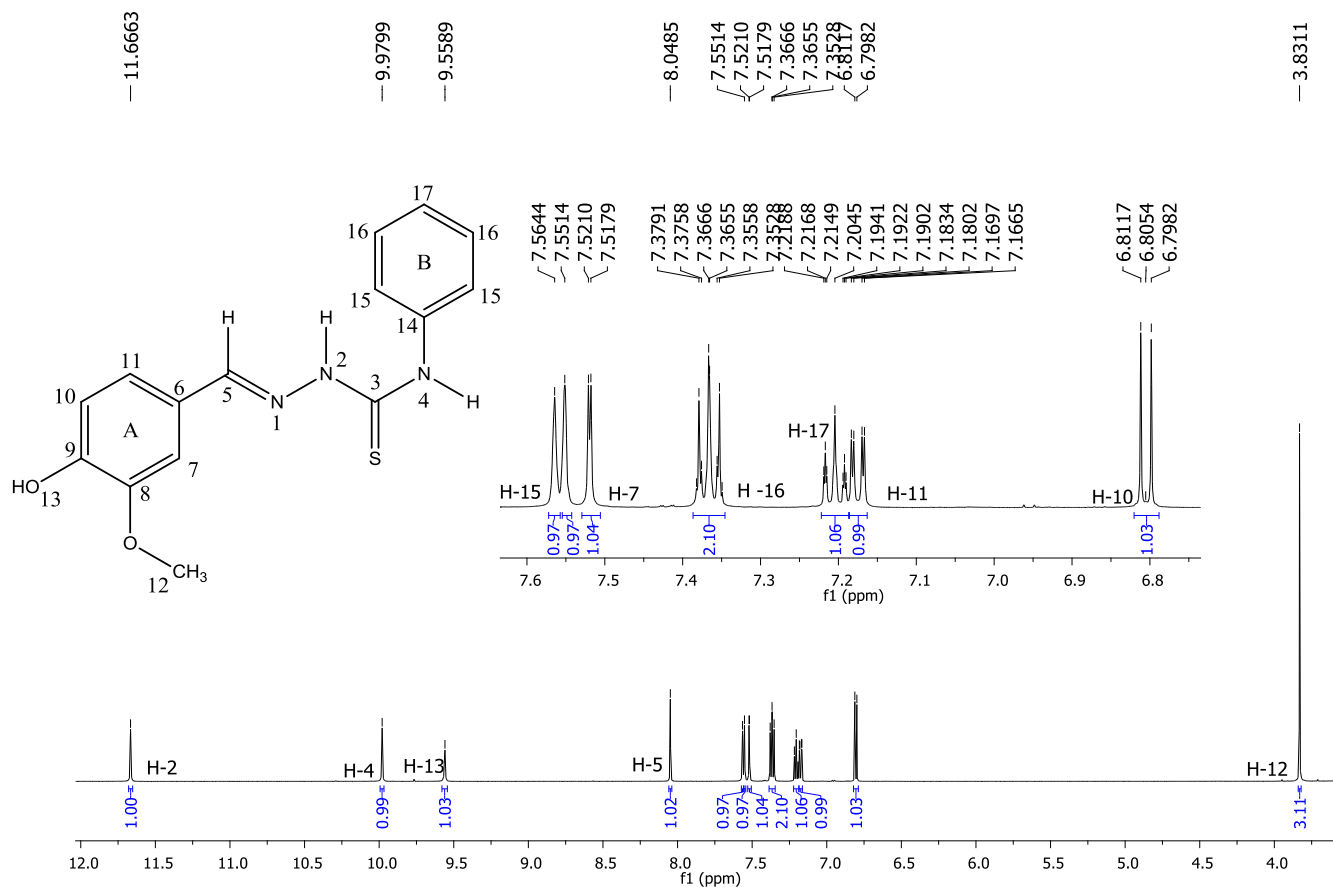


Figura 27 - Espectro de RMN de ¹H de VAPTSC (DMSO.d₆, 600 MHz).

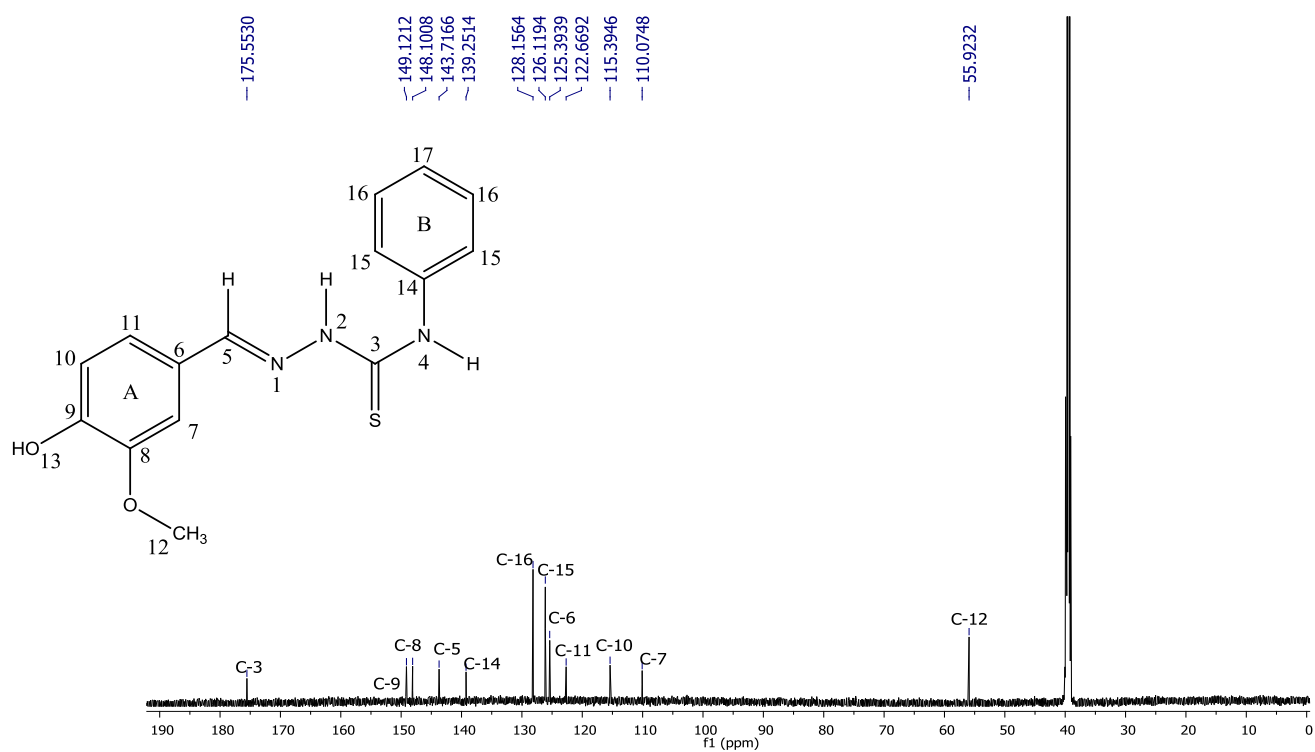


Figura 28 - Espectro de RMN ¹³C de VAPTSC (DMSO.d₆, 600 MHz)..

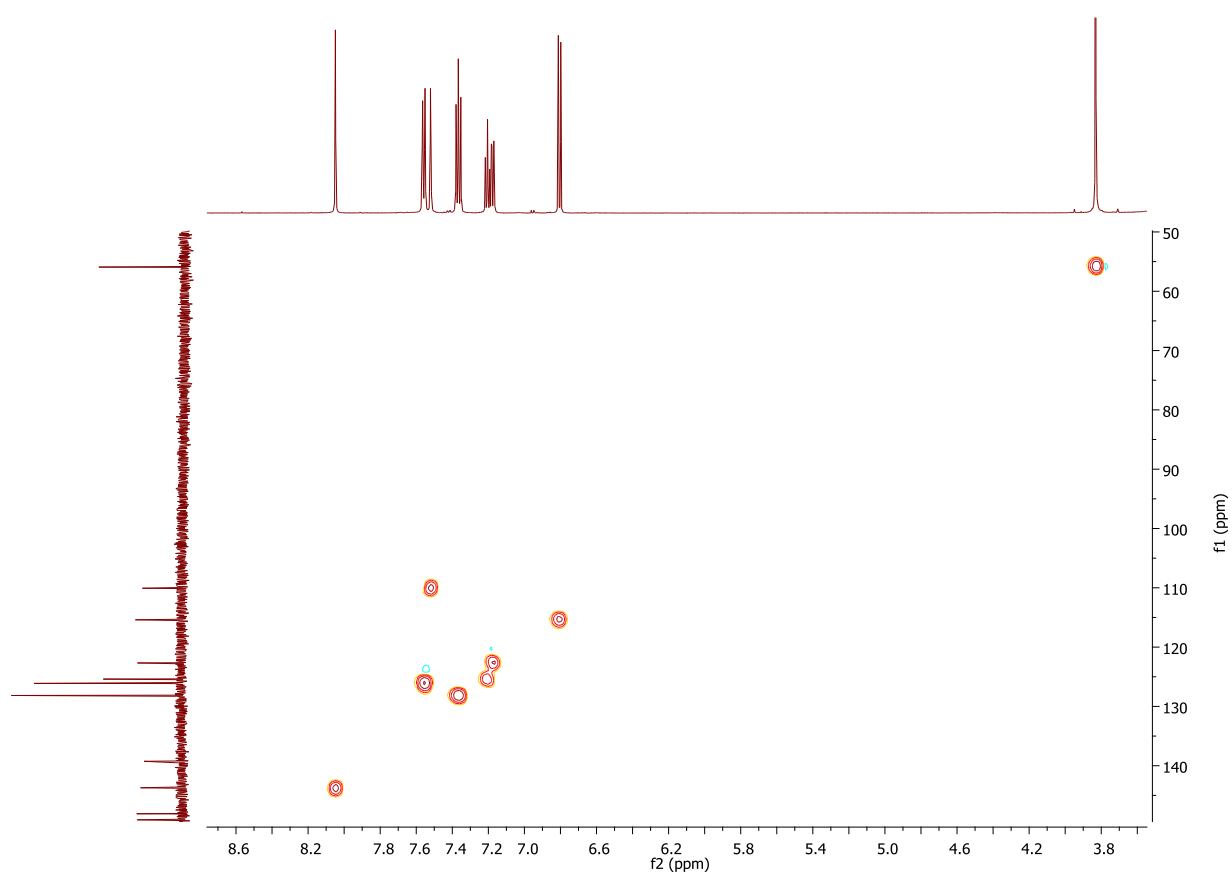


Figura 29 - Espectro de RMN de HSQC ^1H - ^{13}C - J_{CH} de VAPTSC (DMSO.d6, 600 e 150 MHz).

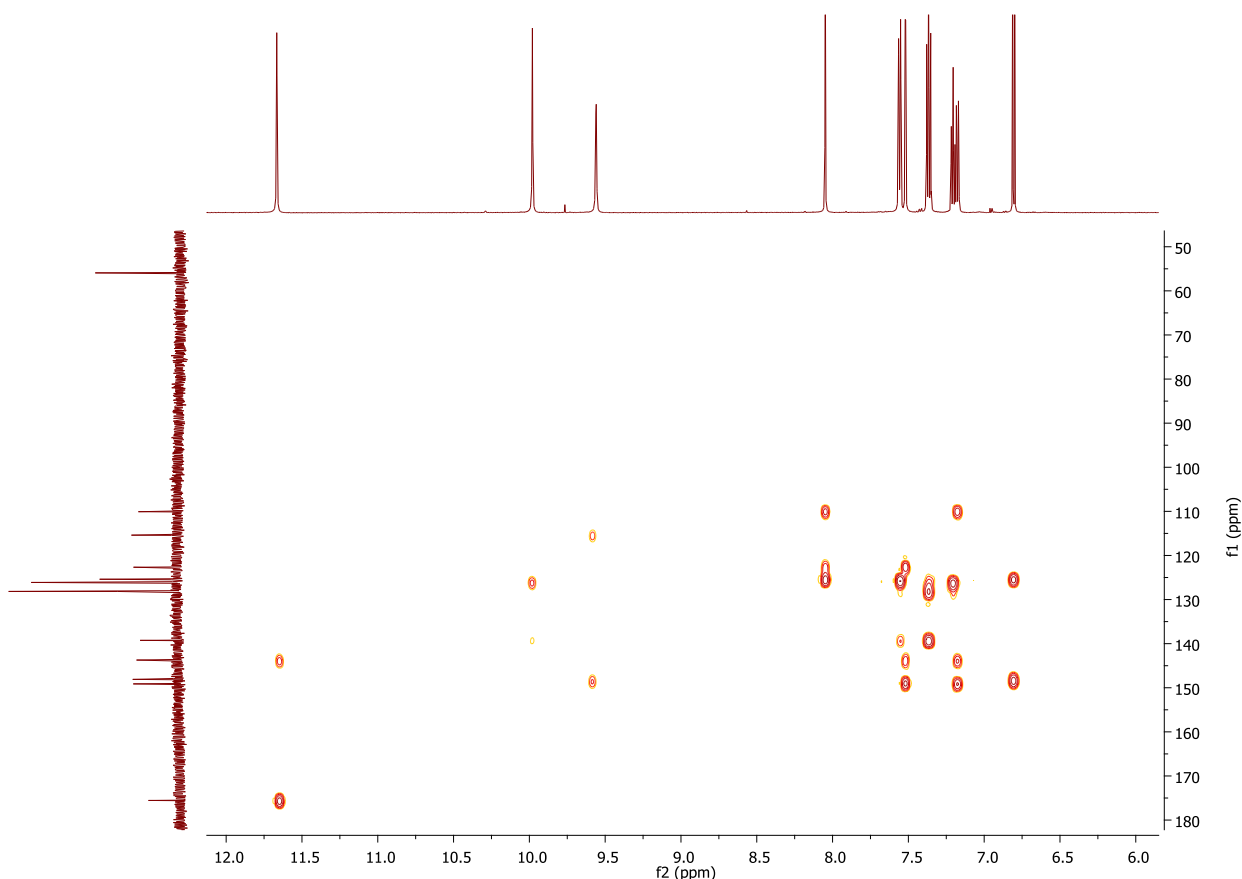


Figura 30- Espectro de RMN de HMBC ^1H - ^{13}C de VAPTSC (DMSO.d6, 600 e 150 MHz).

O espectro de RMN de ^1H de VAPSCO (**Figura 31**) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um duplete em δ 6,80 com constante de acoplamento equivalente a 8,1 Hz, um duplo duplete em δ 7,14 ($J = 8,1$ e 1,9 Hz) e um duplete em δ 7,47 com $J = 1,9$ Hz. Foi observado um simpleto em δ 10,55, referente, ao hidrogênio da ligação N-H de número 2 e um simpleto em δ 9,41 atribuído ao H de número 4. Os sinais em δ 8,85 e em δ 7,84 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das ligações HC=N e O-H. Um simpleto em δ 3,86 corresponde aos hidrogênios presentes em O - CH₃. Os hidrogênios aromáticos do segundo anel apresentaram-se de forma a sugerir H15 como um duplete em δ 7,65, H16 como um triplo triplete de sinal δ 7,29 e H17 como um triplo triplete em δ 7,00.

Com o auxílio dos experimentos de RMN de ^{13}C (**Figura 32**) e associação com os experimentos de HSQC e HMBC realizados para VAPTSC foram possíveis listar sinais de carbono e atribuí-los como: doze sinais relativos a carbonos de anel aromático, conforme a nomeação dos anéis para facilitar a compreensão. No anel A três carbonos são metínicos (δ 109,83; 115,32; 119,81) e três quaternários (δ 121,46; 147,96; 148,37). No anel B cinco

carbonos são metínicos (δ 122,37; 128,48; 125,87), sendo que o valor de δ 125,87 refere-se aos carbonos 15 que são quimicamente equivalentes e o valor de δ 128,48 aos carbonos 16. Outros sinais de C (δ 55,77; 141,34; 153,17), referem-se respectivamente, ao carbono do grupo metoxila, ao carbono de número 6 e ao carbono da ligação C=O (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Dados de RMN 1D e 2D de VAPSCO.

Nº átomo	VAPTSC	
	δ_H^a , N° de H, Mult, J (Hz)	δ_C
1		
2	10,55 (1H; s)	-
3		153,17
4	9,41 (1H; s)	-
5	8,84 (1H; s)	141,34
6	-	121,46
7	7,47 (1H; d; 1,9)	109,83
8	-	147,93
9	-	148,37
10	6,80 (1H; d; 8,2)	115,32
11	7,14 (1H; dd; 1,9 e 8,2)	119,81
12	3,86 (3H; s)	55,77
13	7,84 (1H; 1s)	-
14	-	139,20
15	7,65 (1H; d)	125,87
16	7,29 (1H; tt)	128,48
17	7,00 (1H; tt)	122,37

^aEspectros obtidos em DMSO.d6, 600/150MHz.

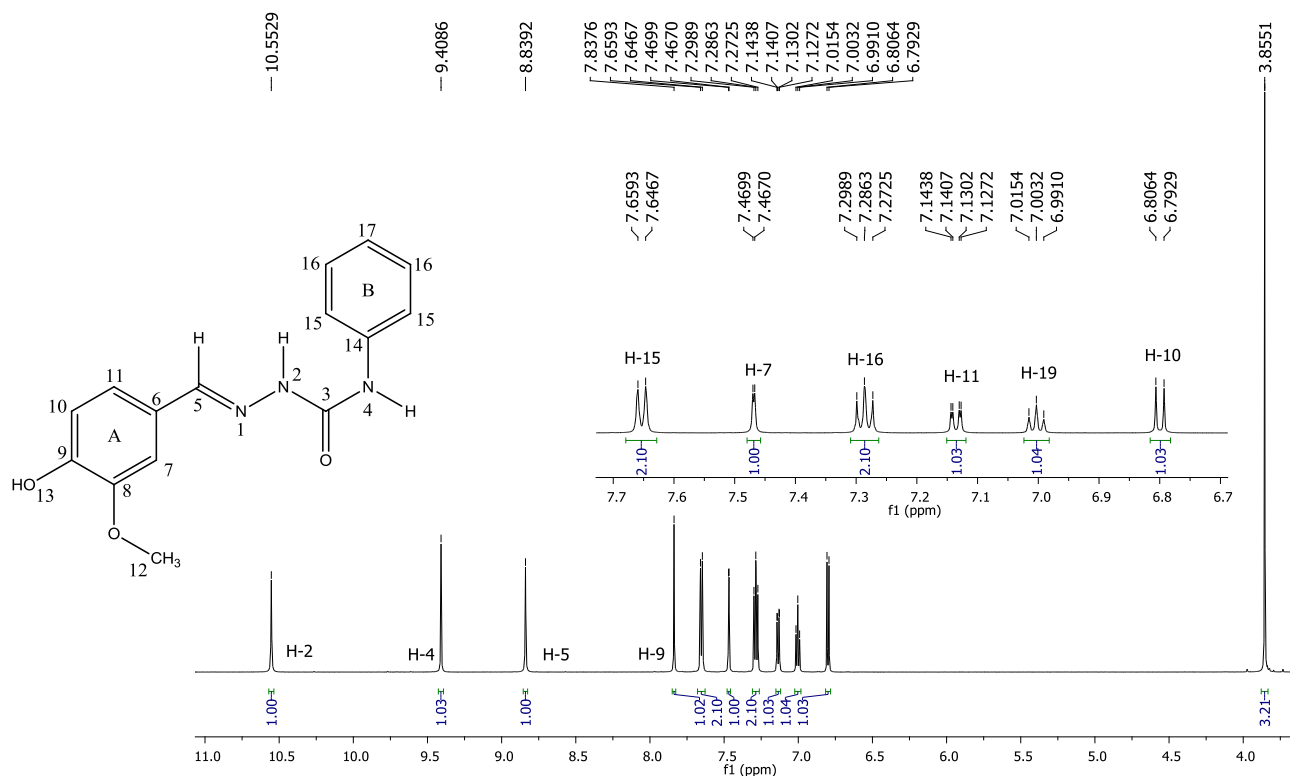


Figura 31 - Espectro de RMN de ¹H de VAPSCO (DMSO.d₆, 600 MHz).

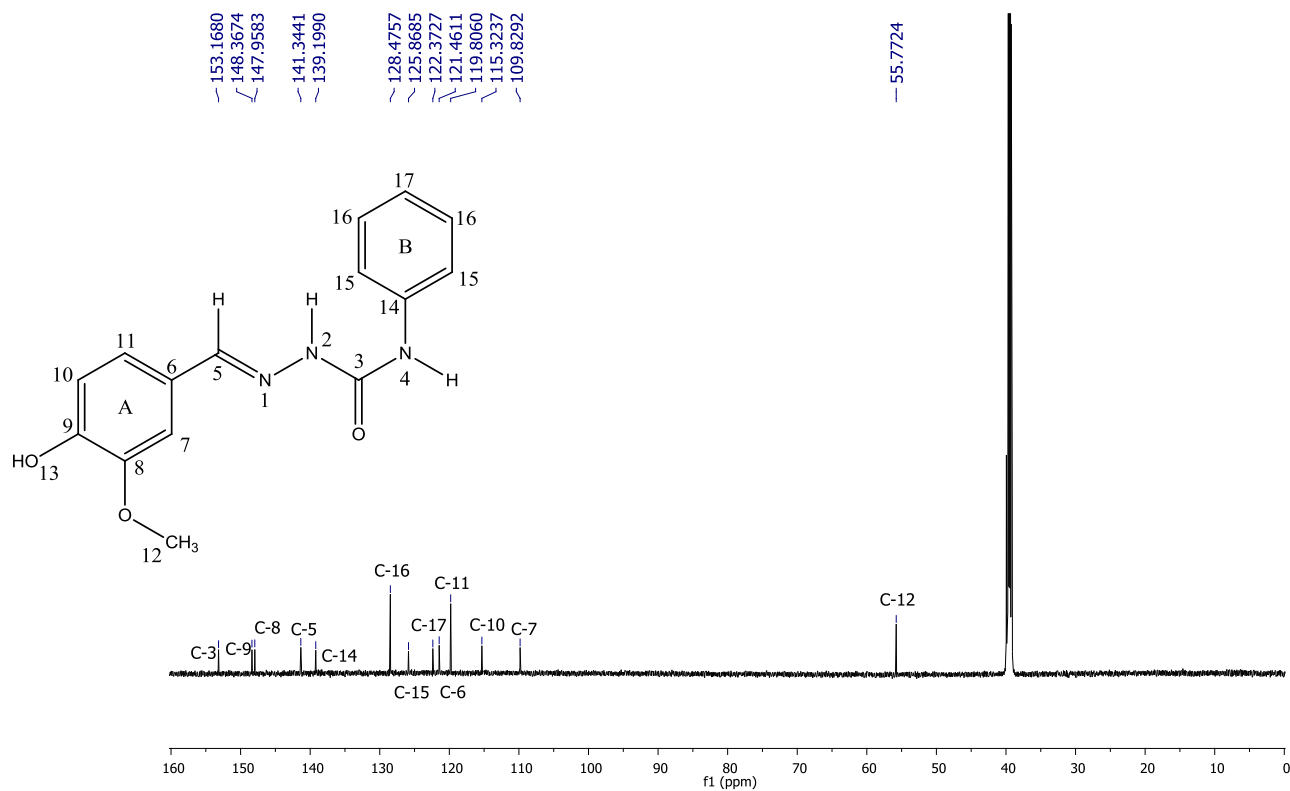


Figura 32 - Espectro de RMN de ¹³C de VAPSCO (DMSO.d₆, 600 MHz).

4.1.5 Espectrometria de Massas

A molécula protonada do ligante VATSC observada no espectro de massas, modo positivo, indicou uma m/z de 226,1 (**Figura 33**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_9H_{11}O_2N_3S$. A análise de fragmentos (**Figura 34**) permitiu sugerir algumas estruturas de fragmentação.

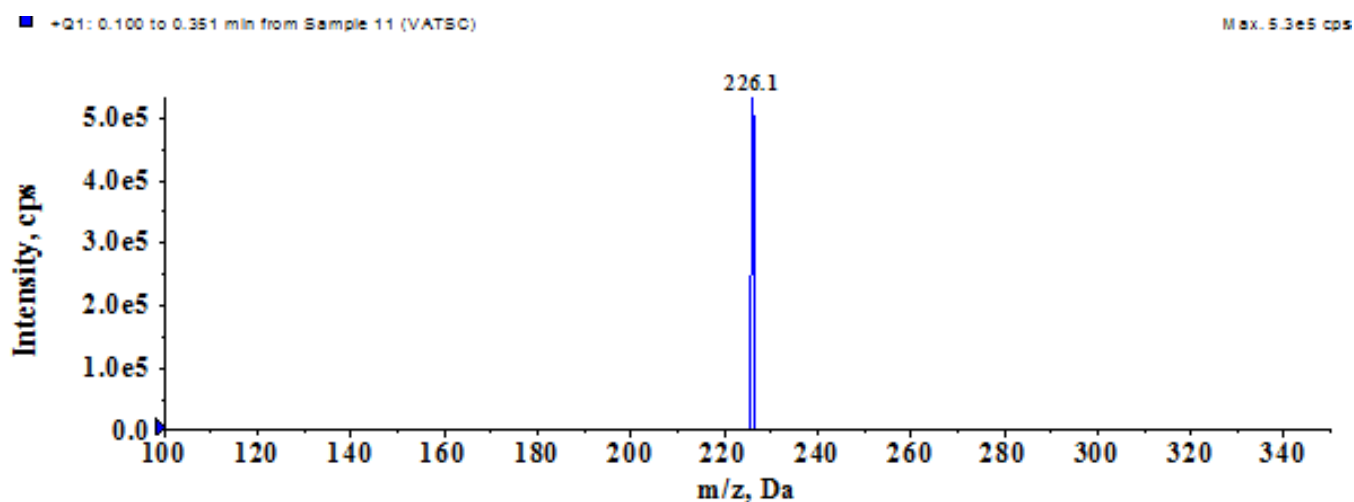


Figura 33 - Espectro de massas obtido por ESI de VATSC em solução metanólica (modo positivo)

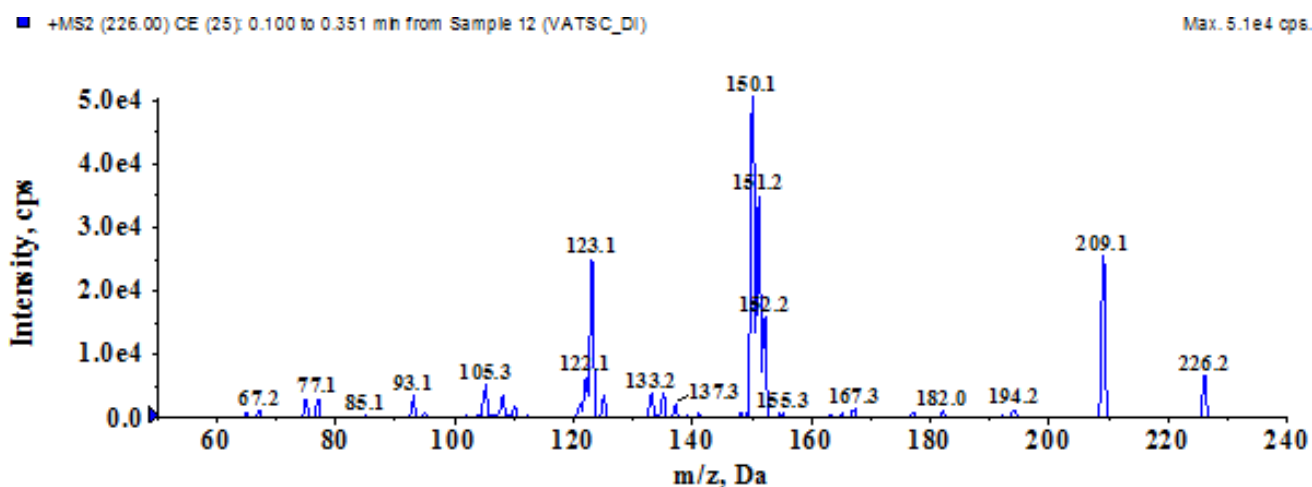
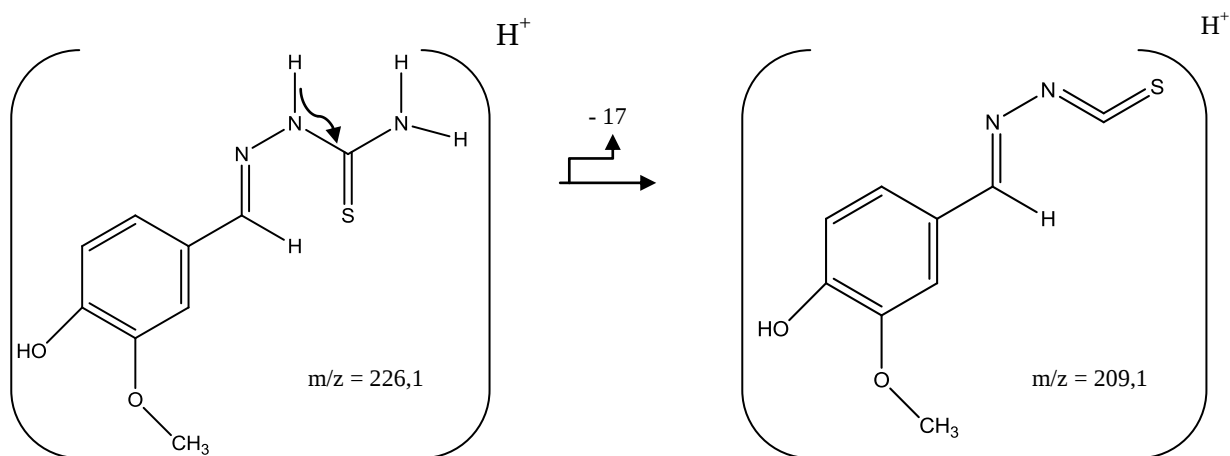


Figura 34 - Espectro de massas obtido por ESI de VATSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações

O estudo do espectro de massas permitiu propor a seguinte fragmentação:



A molécula protonada do ligante VAMTSC observada no espectro de massas, modo positivo, indicou uma m/z de 240,1 (**Figura 35**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{13}O_2N_3S$. A análise de fragmentos (**Figura 36**) permitiu sugerir:

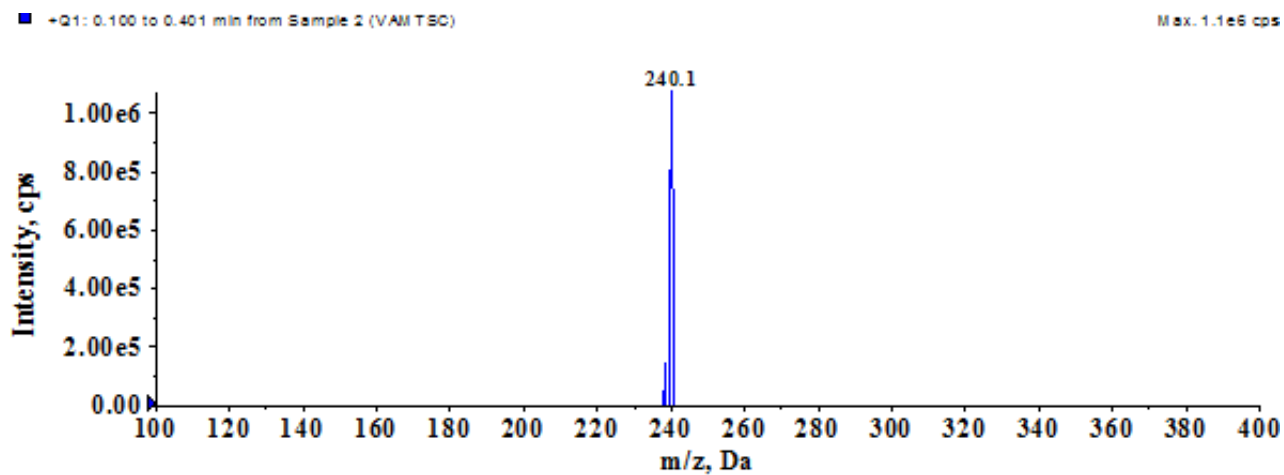


Figura 35- Espectro de massas obtido por ESI de VAMTSC em solução metanólica (modo positivo)

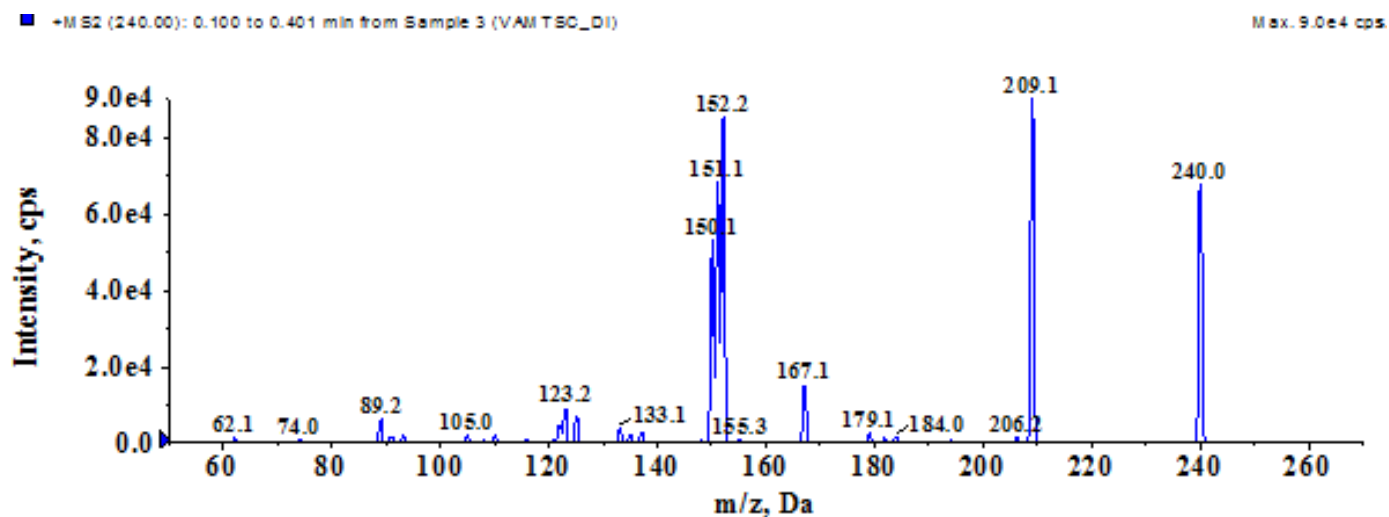
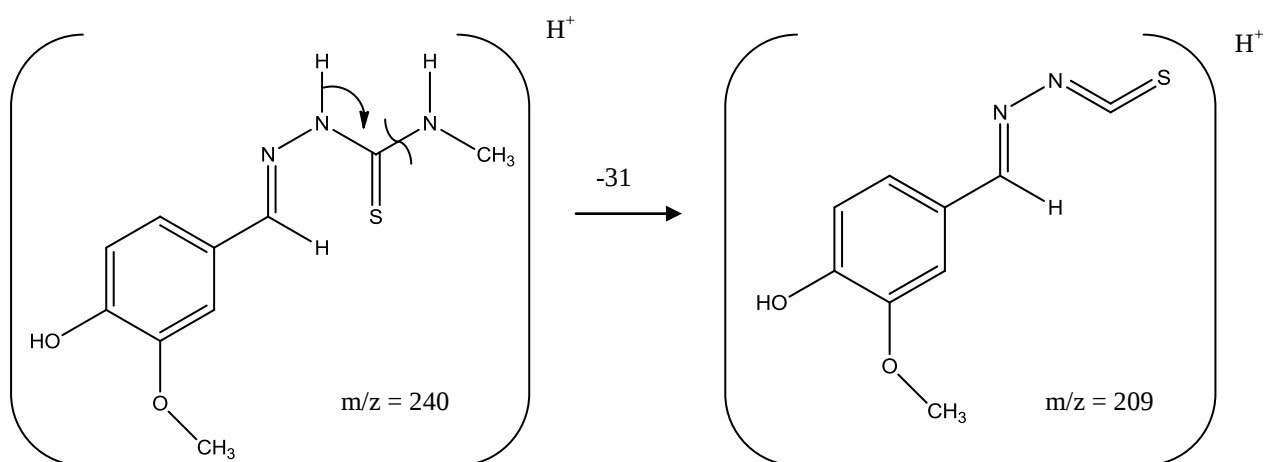
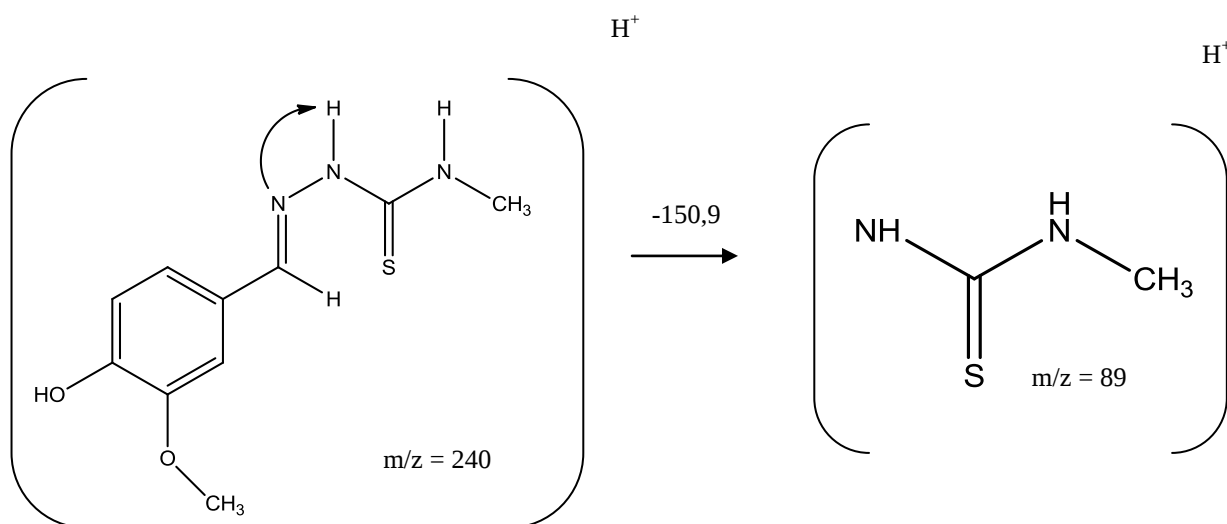
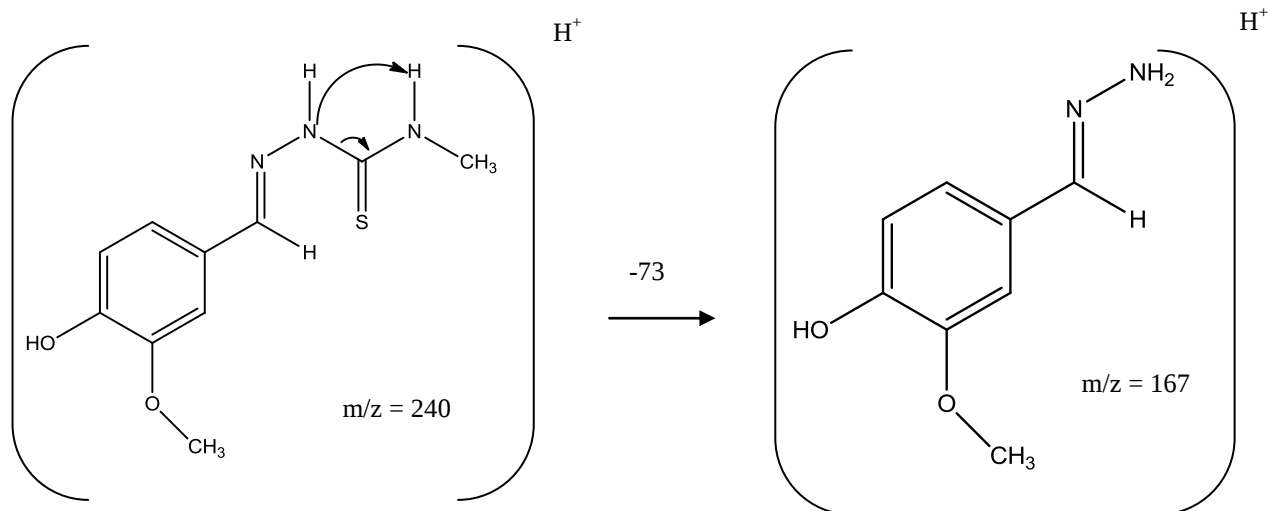
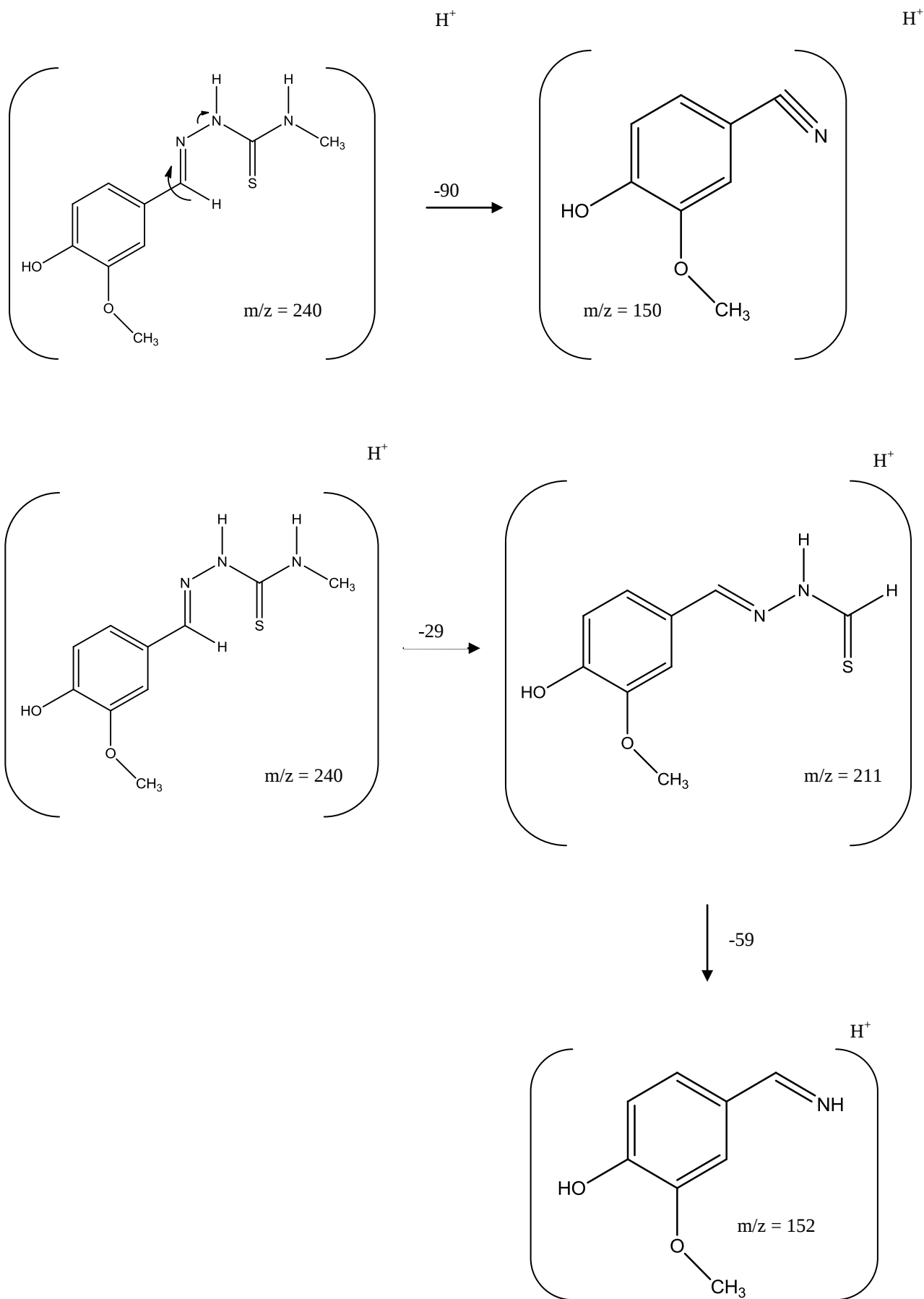


Figura 36 - Espectro de massas obtido por ESI de VAMTSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações

O estudo do espectro permitiu propor as fragmentações:







A molécula protonada do ligante VAETSC observada no espectro de massas, modo positivo, indicou uma m/z de 254,2 (**Figura 37**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{15}O_2N_3S$. A análise de fragmentos (**Figura 38**) permitiu sugerir algumas estruturas de fragmentação,

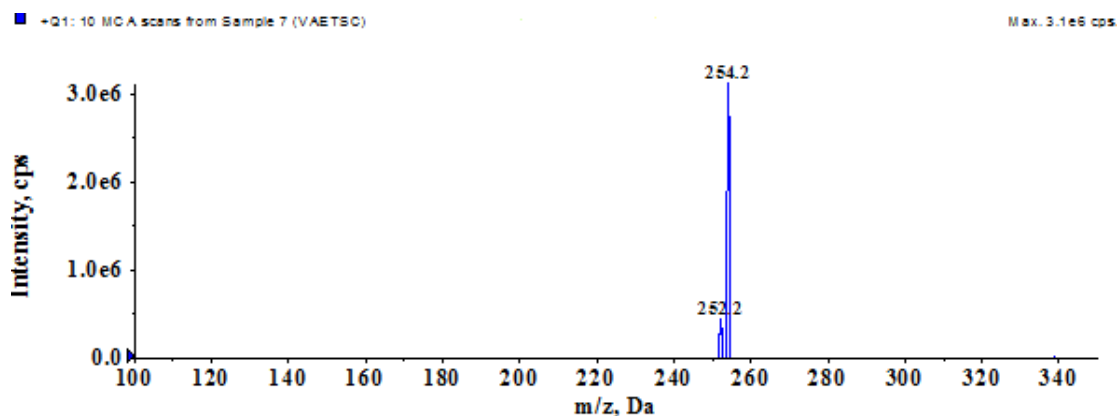


Figura 37 - Espectro de massas obtido por ESI de VAETSC em solução metanólica (modo positivo).

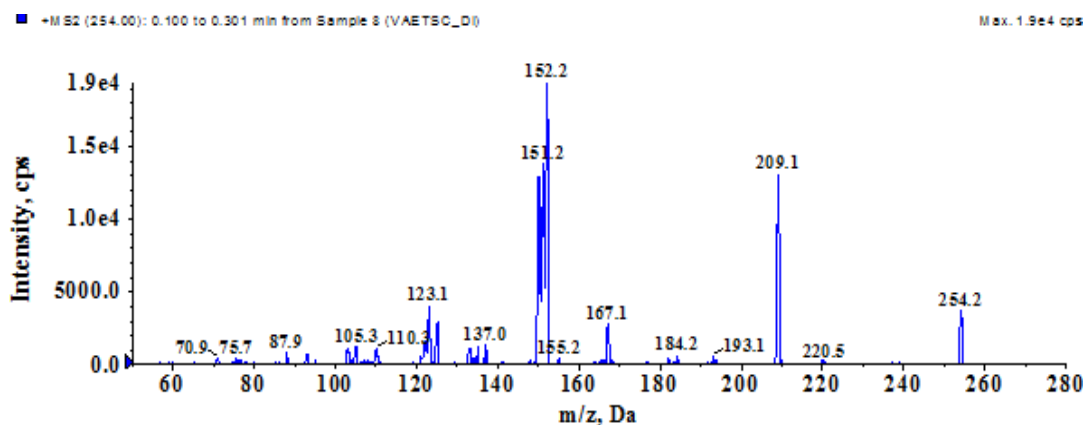
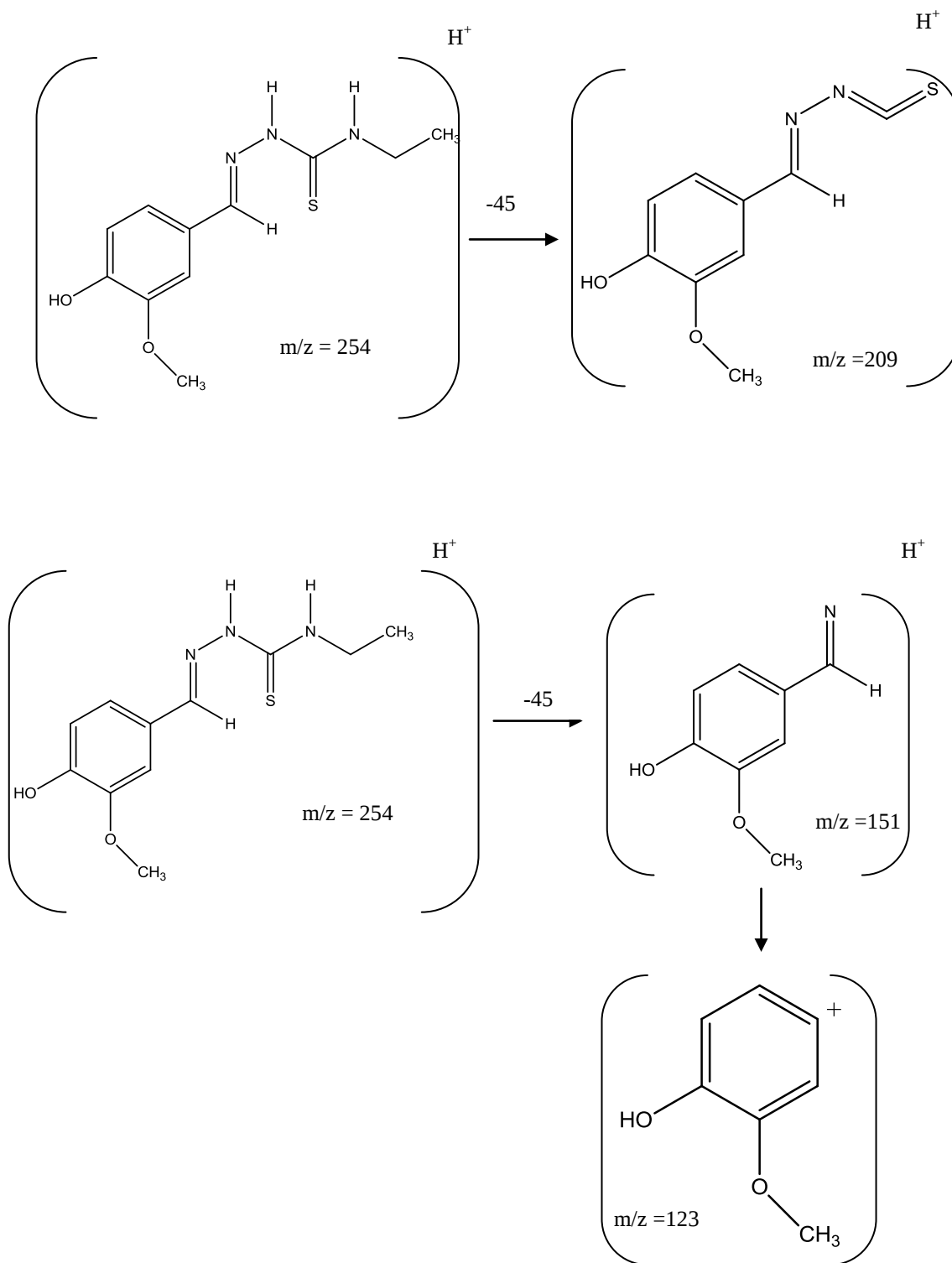


Figura 38 - Espectro de massas obtido por ESI de VAETSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações.

O estudo do espectro de massas permitiu propor as seguintes fragmentações:



A molécula protonada do ligante VAPTSC observada no espectro de massas, modo positivo, indicou uma m/z de 302,1 (**Figura 39**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{15}O_2N_3S$. A análise de fragmentos (**Figura 40**) permitiu sugerir algumas estruturas de fragmentação.

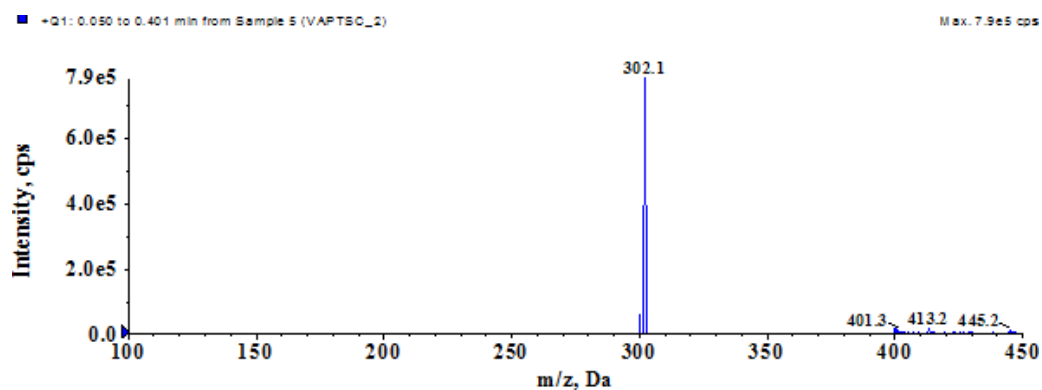


Figura 39 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPTSC em solução metanólica (modo positivo).

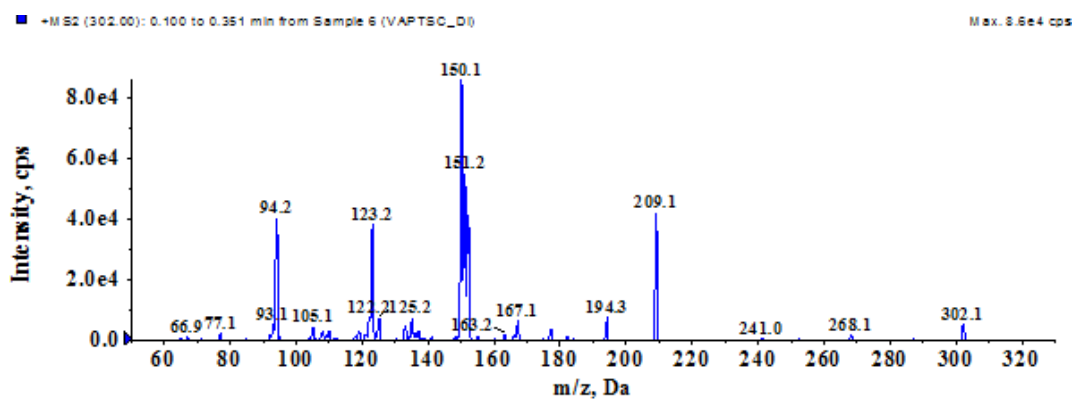
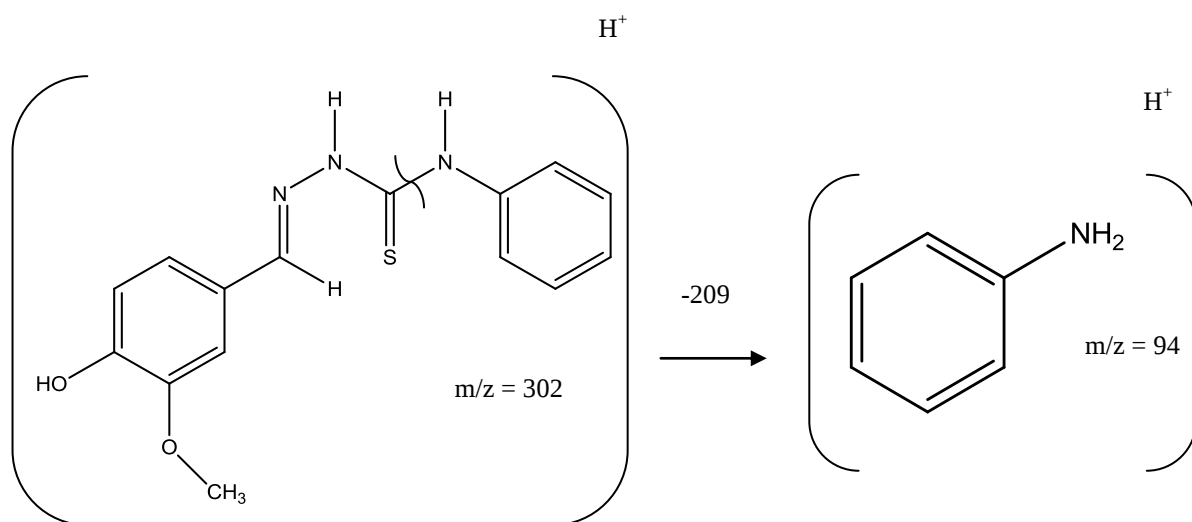
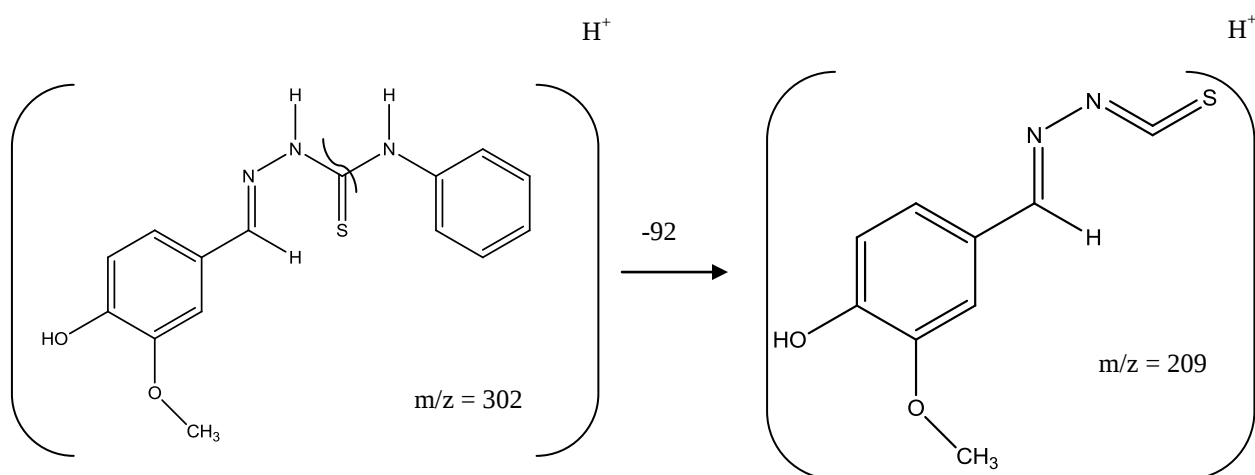


Figura 40 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPTSC em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações.



A molécula protonada do ligante VAPSCO observada no espectro de massas, modo positivo, indicou uma m/z de 286,3 (**Figura 41**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{15}O_3N_3S$. Os fragmentos (**Figura 42**) apresentaram padrão semelhante aos anteriormente expostos.

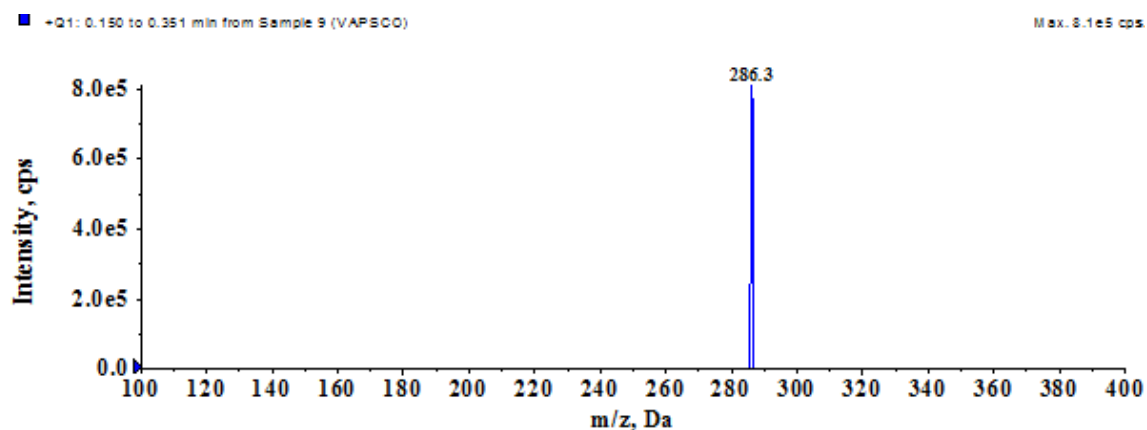


Figura 41 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPSCO em solução metanólica (modo positivo).

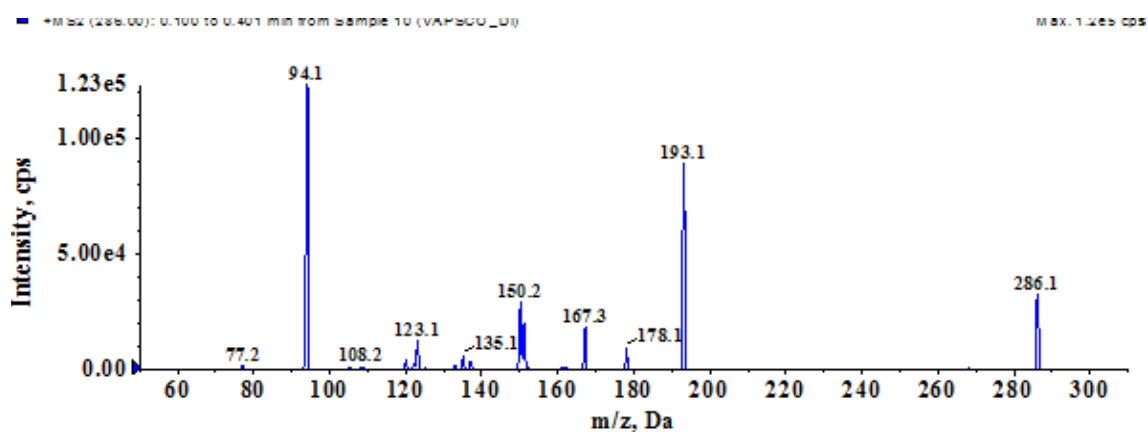
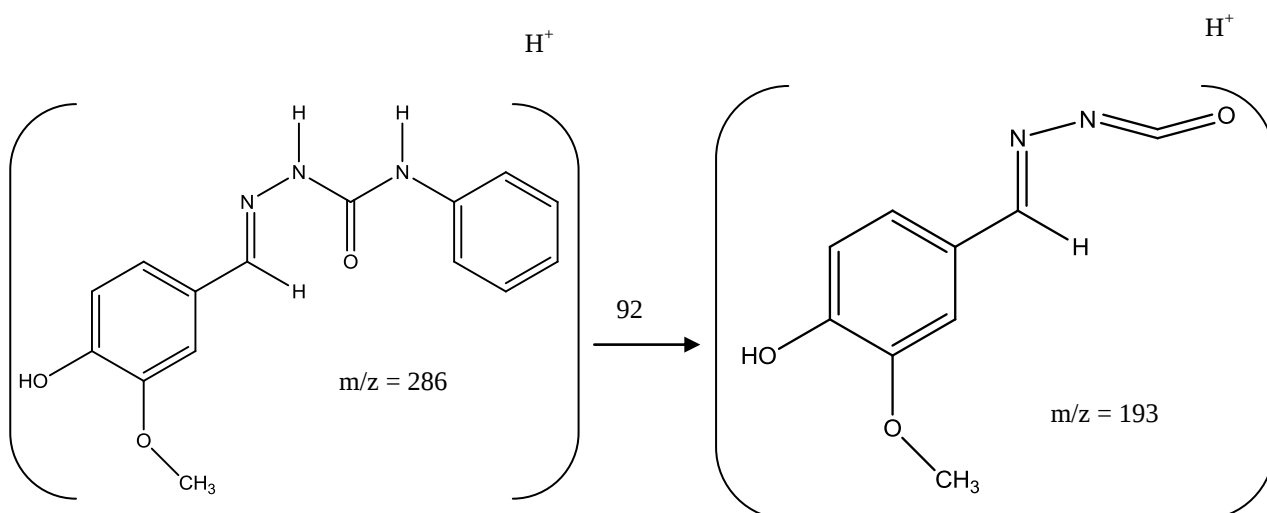


Figura 42 - Espectro de massas obtido por ESI de VAPSCO em solução metanólica (modo positivo) - fragmentações.



4.1.6 Ensaios biológicos

Na literatura, são relatadas tiossemicarbazonas com atividade antibacteriana²⁶, antiviral²⁷ e antitumoral,²⁸ antifúngica⁴⁵ e anticonvulsiva⁴⁵ (**Figura 43**) o que evidencia uma grande versatilidade farmacológica desses compostos aplicados na síntese de uma variedade de drogas sintéticas. Por conta da capacidade quelante desses compostos há um favorecimento em mecanismos bioquímicos, sendo a atividade anticâncer a mais explorada. O mecanismo antitumoral das tiossemicarbazonas atua na inibição da síntese do DNA através de processos envolvendo complexos e / ou enzimas associadas ao desenvolvimento de células cancerosas e geração de espécies reativas de oxigênio⁴⁵.

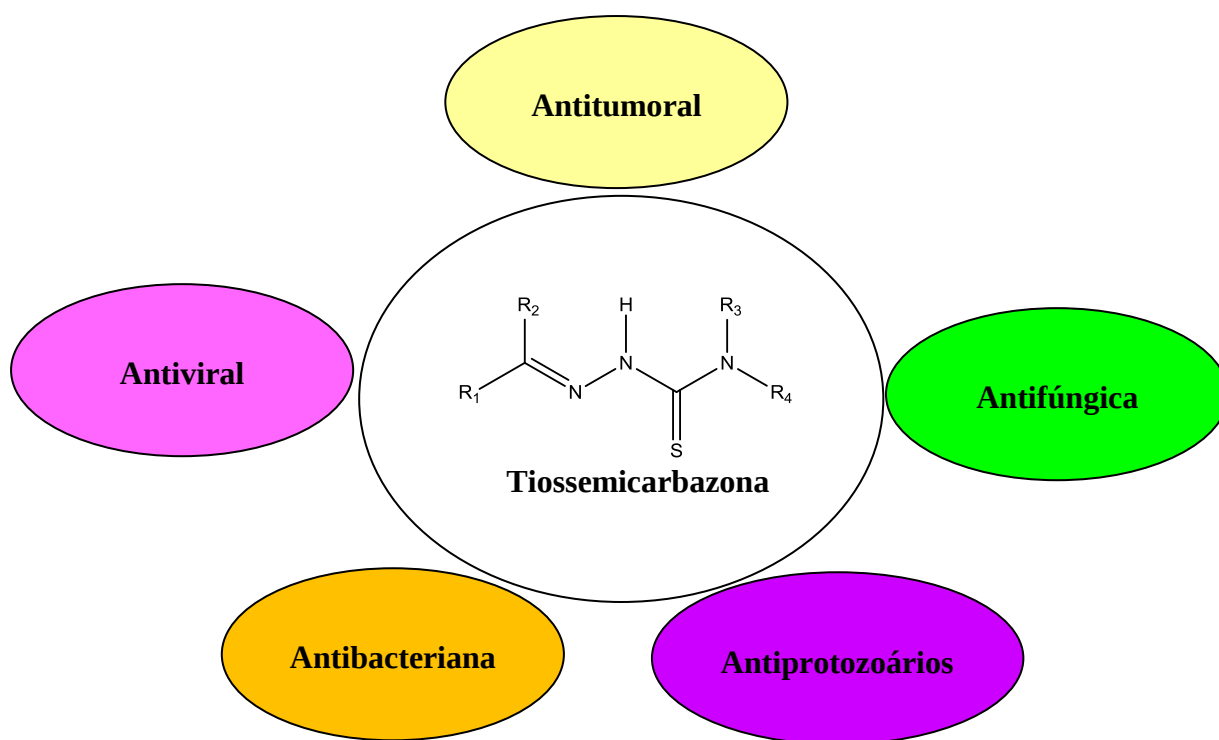


Figura 43 - Perfil geral de atividades biológicas das tiossemicarbazonas
Adaptado de Siqueira, et al, 2019.

Juntamente com as tiossemicarbazonas, os tiazóis e tiazolidinas participam de uma gama de compostos com interessante potencial biológico. Estudos avaliam através de ensaios biológicos a capacidade inibitória frente a células tumorais e micro-organismos. Assim, propõe-se o estudo do potencial citotóxico frente a células MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) e antibacteriano frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Os ensaios de citotoxicidade frente à linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) realizados em duplicata - ensaios 1 e 2 demonstrados no gráfico - indicaram para o ligante VAETSC, a partir do valor médio obtido da duplicata, um IC₅₀ equivalente a 24,67 µM (**Figura 44**), de 41,48 µM para VAPTSC e maior que 100 µM para os outros ligantes. Na literatura, são relatadas tiossemicarbazonas com potencial citotóxico interessante frente a células MCF-7 em valores de 76 e 54 µM com efeito citotóxico baixo frente às células normais.³⁷ Portanto, para os ligantes em estudo neste trabalho, podemos sugerir que sua atividade antitumor *in vitro* está equivalente com o esperado para esse grupo de compostos.

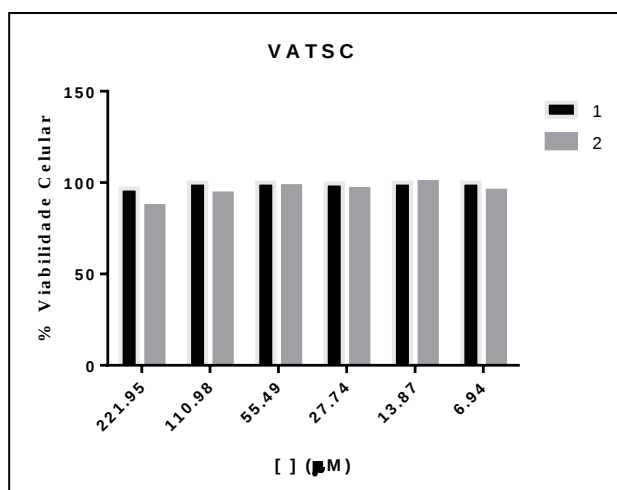


Figura 44 - Ensaio citotóxico VATSC

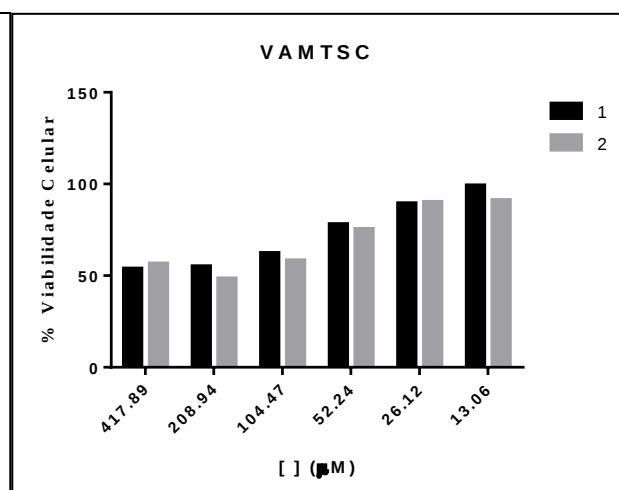


Figura 45 - Ensaio citotóxico VAMTSC

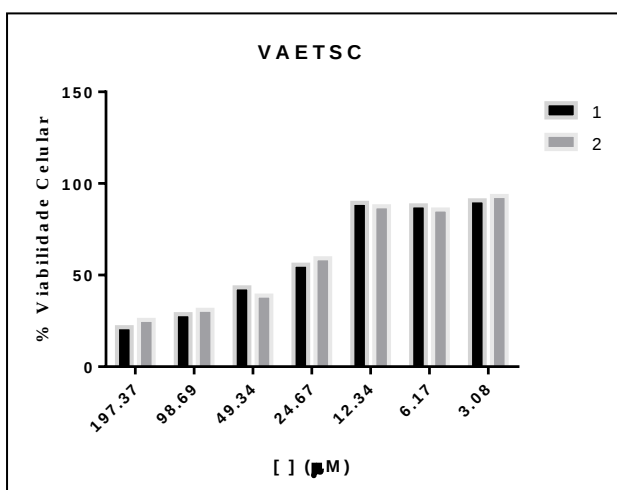


Figura 46 - Ensaio citotóxico VAETSC

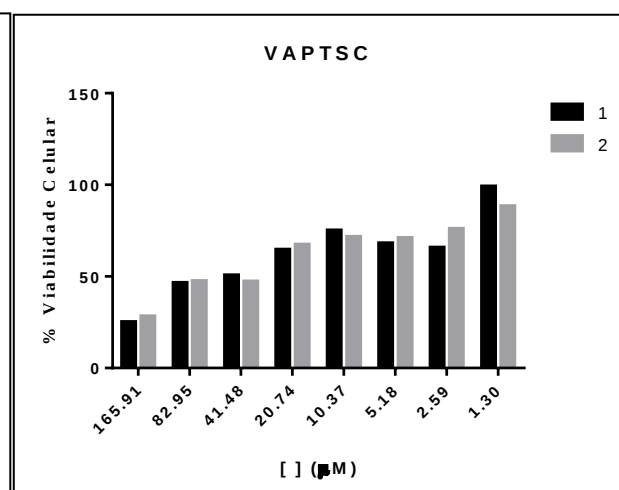


Figura 47 - Ensaio citotóxico VAPTSC

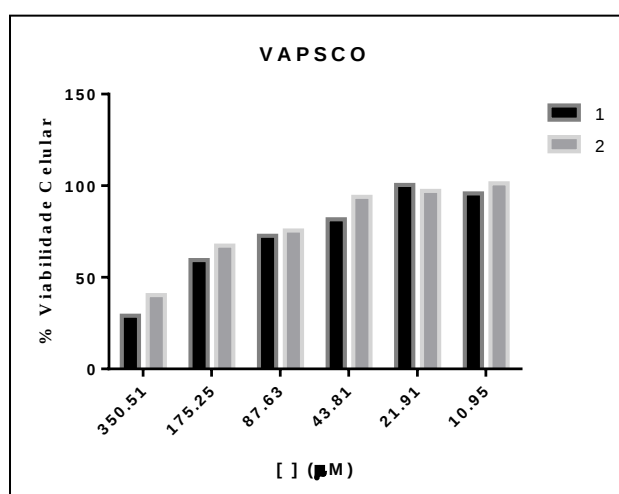


Figura 48 - Ensaio citotóxico VAPSCO

Em levantamento bibliográfico encontra-se entre ensaios bacterianos realizados na literatura, por exemplo, a seguinte tiossemicarzabona com atividade antimicrobial promissora frente a bactérias gram-positivas. Para o composto esquematizado na **Figura 49** em relação ao organismo *Staphylococcus aureus* ATCC6538 a concentração inibitória mínima foi de 4-8 ($\mu\text{g/mL}$)⁴⁶. Já os ensaios biológicos realizados com os ligantes demonstraram uma melhor inibição dos mesmos em relação à *Escherichia coli* (gram negativa) em comparação com a *Staphylococcus aureus* (gram positiva), indicando uma interessante inibição em bactérias com estrutura de parede celular complexa. Sendo as tiossemicarbazonas conhecidas por um amplo perfil farmacológico, tais resultados sugerem o potencial dessa classe de compostos como anti-bacterianos, devido aos grupos substituintes e às possíveis modificações estruturais que ocorrem nos compostos durante o contato com o meio biológico lipofílico, além disso, as tiossemicarbazonas e semicarbazonas apresentam relatos de aumento de atividade quando complexadas. Para o teste biológico com a *Staphylococcus aureus* o ligante VAPTSC, praticamente, não apresentou inibição.

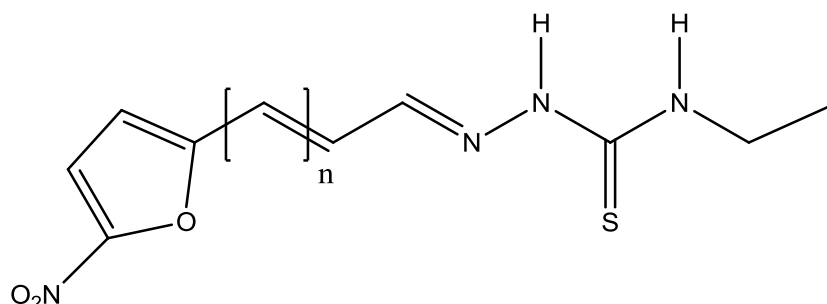


Figura 49 - Tiossemicarbazona com atividade antibacteriana descrita em literatura.

Fonte: Adaptado de Rathbone, 2008.

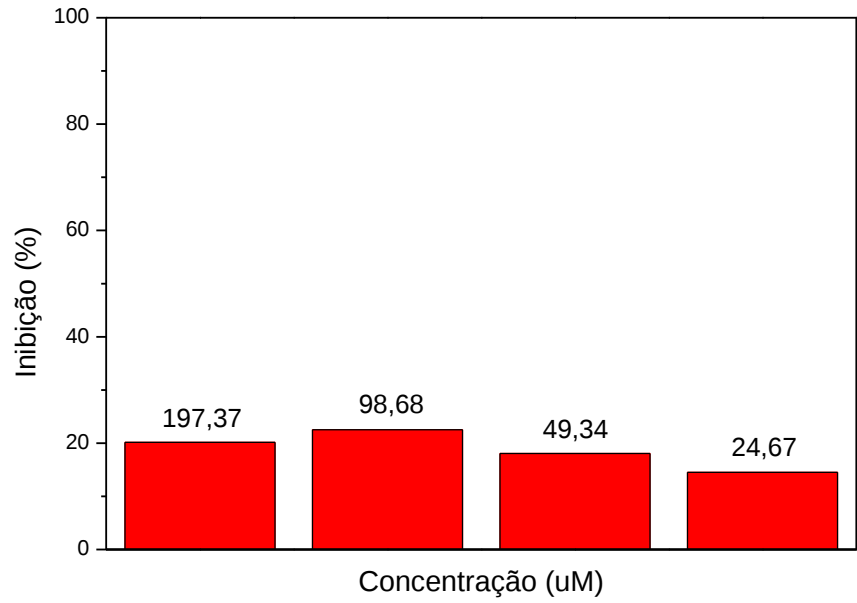


Figura 50 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VAETSC

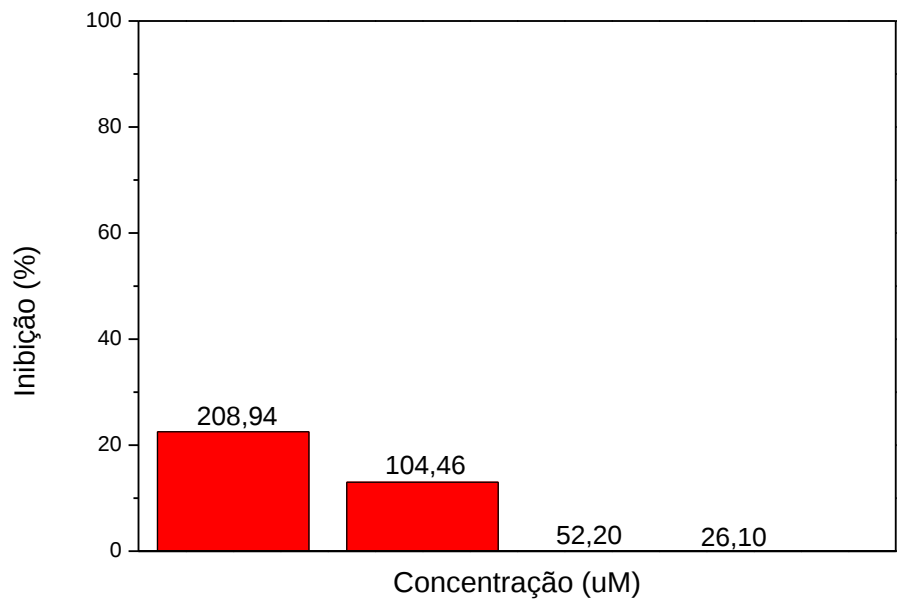


Figura 51 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VAMTSC

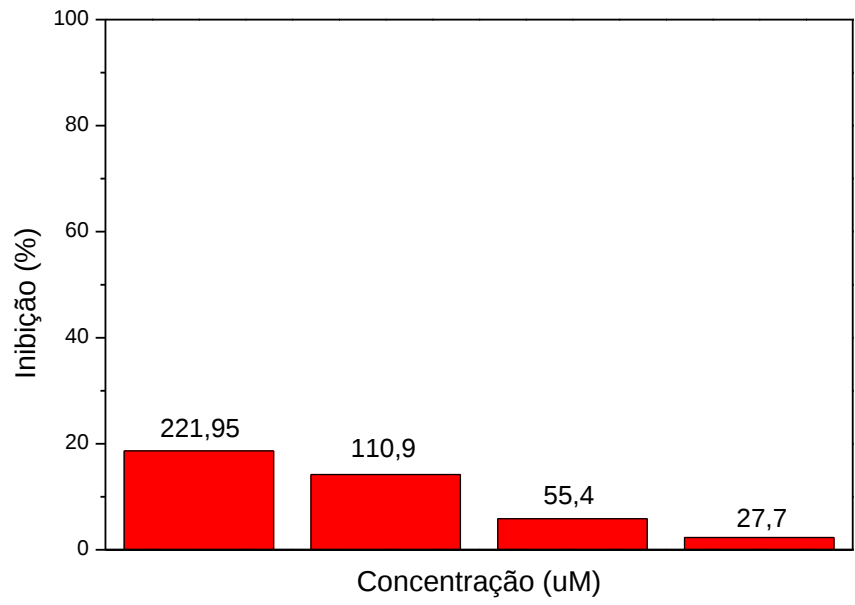


Figura 52 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VATSC

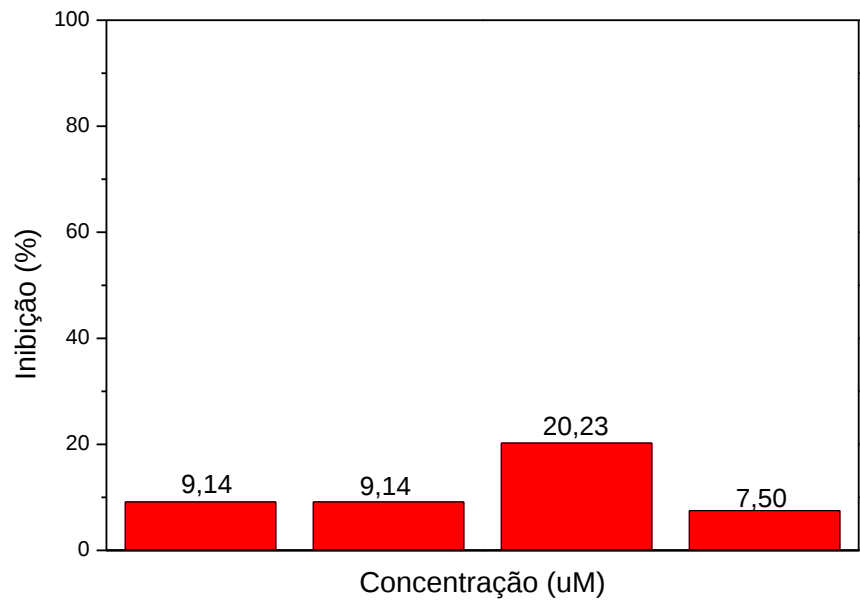


Figura 53 - Ensaio biológico frente à *Staphylococcus aureus* - VAPSCO

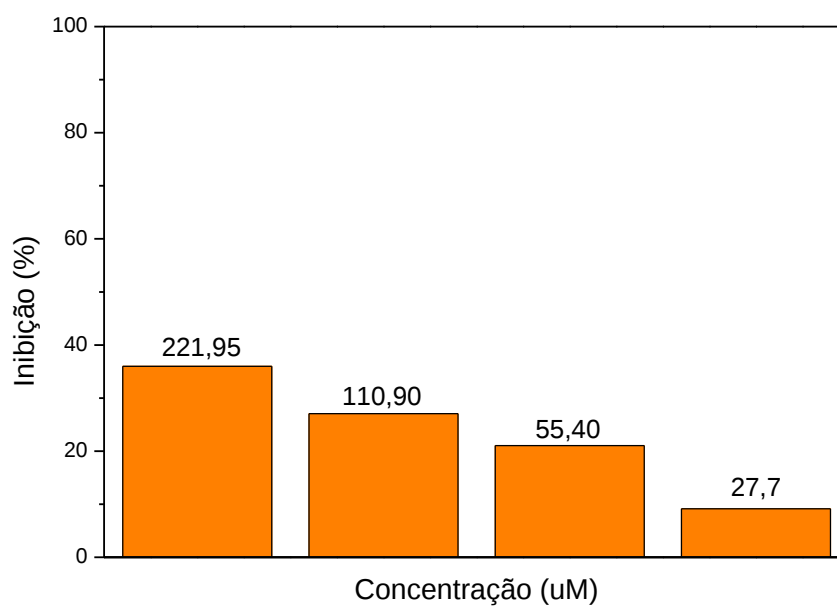


Figura 54 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VATSC

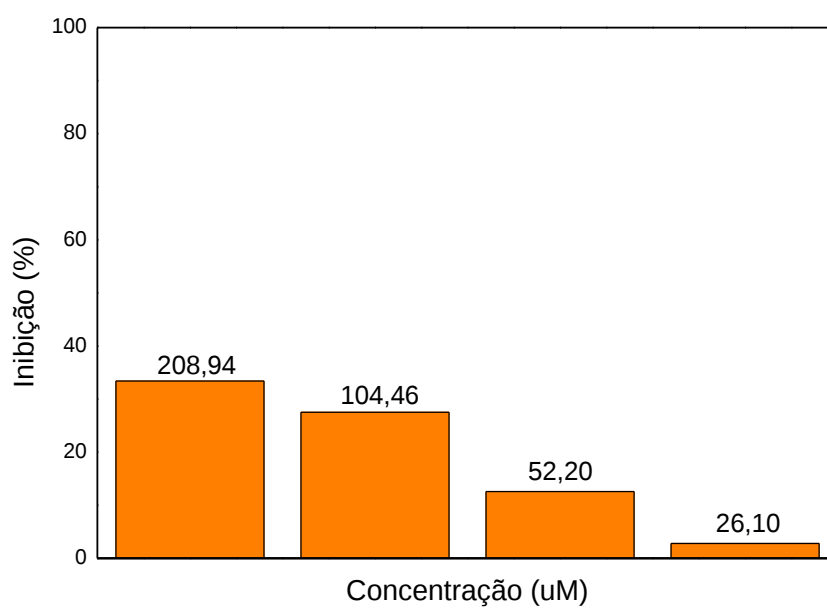


Figura 55 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAMTSC

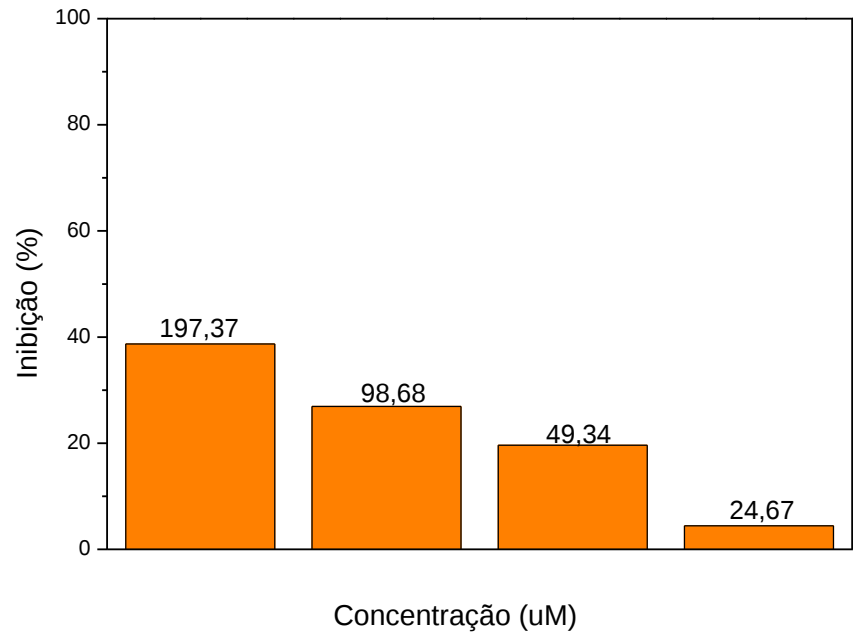


Figura 56 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAETSC

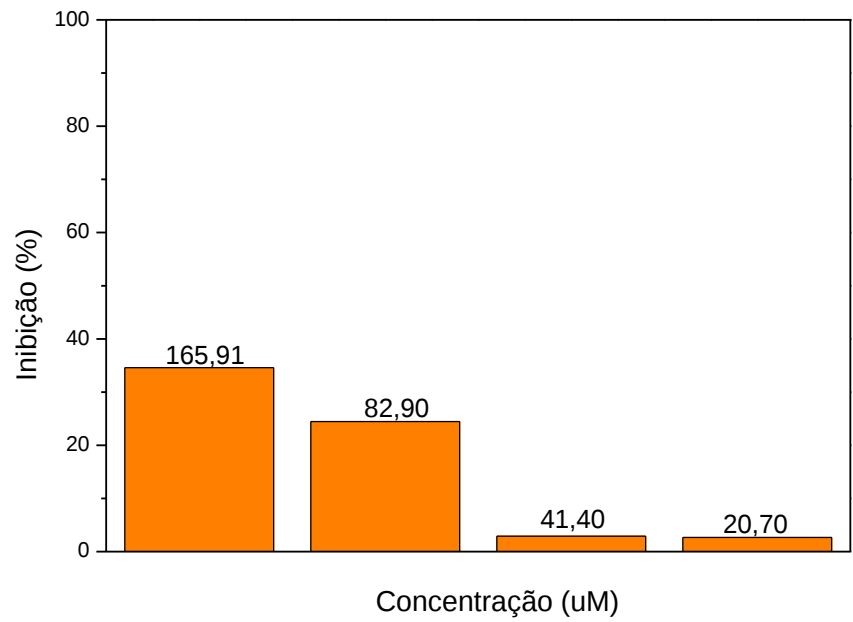


Figura 57 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAPTSC

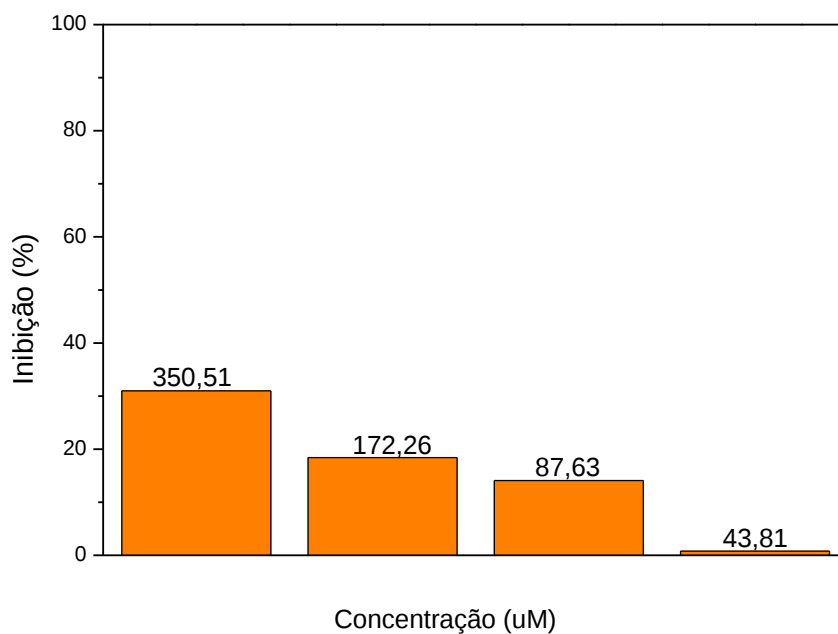
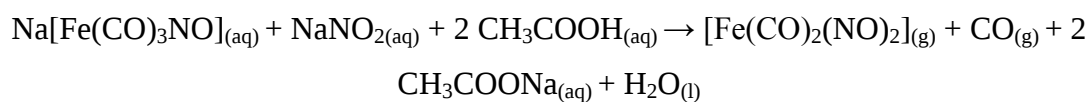
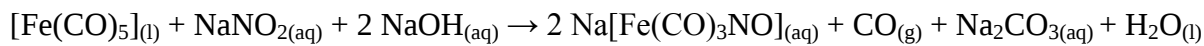


Figura 58 - Ensaio biológico frente à *Escherichia coli* - VAPSCO

4.2 Complexos

O complexo precursor (**Figura 59**) produzido a partir de hidróxido de sódio e nitrito de sódio apresenta duas etapas como demonstradas a seguir:



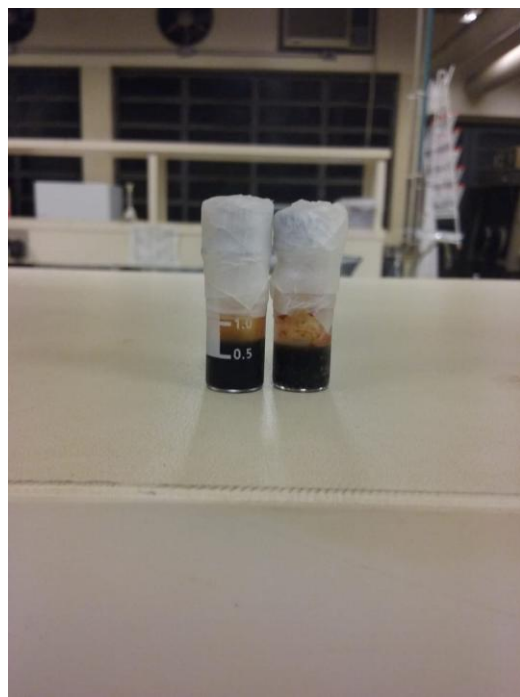


Figura 59 - Imagens da síntese do complexo precursor **a)** Balão de síntese **b)** Dicarbonildinitrosilferro

O dinitrosilo formado apresenta coloração vermelha característica e um espectro de absorção na região do infravermelho com duas bandas de estiramento CO entre 2015 cm^{-1} a 2085 cm^{-1} , duas bandas características de estiramento NO presentes no intervalo de 1720 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , bandas em torno de 810 cm^{-1} e 750 cm^{-1} sugestivas de estiramento Fe-NO e em 478 cm^{-1} ao estiramento Fe-C como pode ser observado na **Figura 60**.

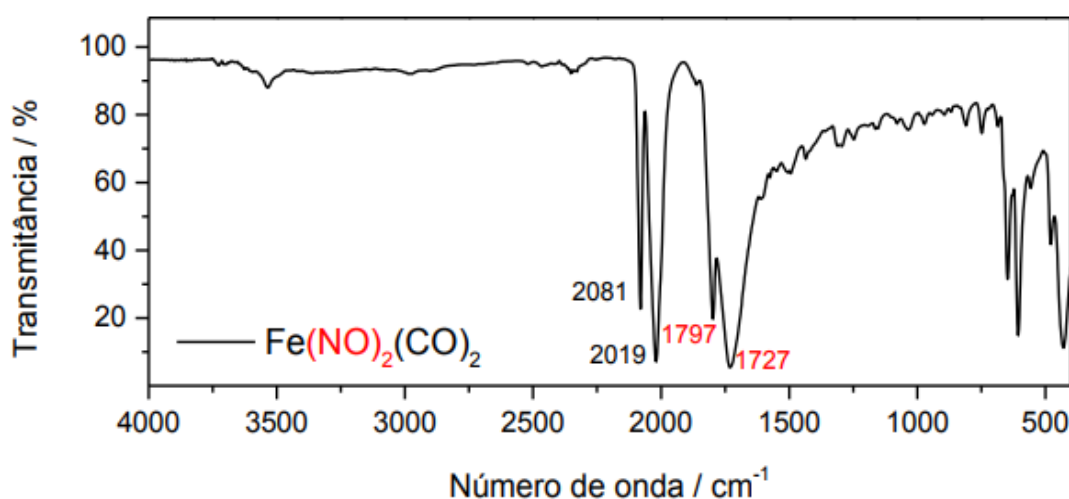
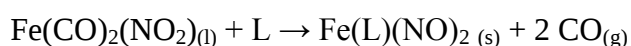


Figura 60 - Espectro de Infravermelho para o precursor $[\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{NO})_2]$

Fonte: Adaptado de Zanetti.

Encontra-se em literatura que a síntese dos complexos produzidos a partir do dinitrosilo de ferro ocorre em um tempo de 6 horas³¹. Para analisar as mudanças estruturais no decorrer da reação, bem como propor um tempo menor para a realização da síntese feita em atmosfera inerte, foi realizado um acompanhamento por infravermelho da reação de produção do complexo a partir do ligante VAMTSC. Os espectros obtidos da reação entre o complexo $[\text{Fe}(\text{CO})_2(\text{NO})_2]$ e o ligante VAMTSC (**Figura 61**) apresentam bandas de estiramento NO na região de 1794 cm^{-1} e 1724 cm^{-1} , a ausência de bandas características de CO indicando uma possível substituição do grupo CO pelo ligante e a ausência de banda em torno de 470 cm^{-1} atribuída ao Fe-C.^{38,39} Após um tempo de 30 minutos de reação, foi observado a diminuição dos picos relativos ao dinitrosilo produzido, indicando que poderia ocorrer a liberação do ligante nitrosil da esfera de coordenação. Assim, por meio da análise da intensidade das bandas em 1794 cm^{-1} e 1724 cm^{-1} em função do tempo de reação, pôde-se concluir que o tempo de reação ideal para síntese destes compostos seria de no máximo 30 minutos.



O acompanhamento por infravermelho com destaque para a absorção característica de estiramento NO pode ser visto abaixo:

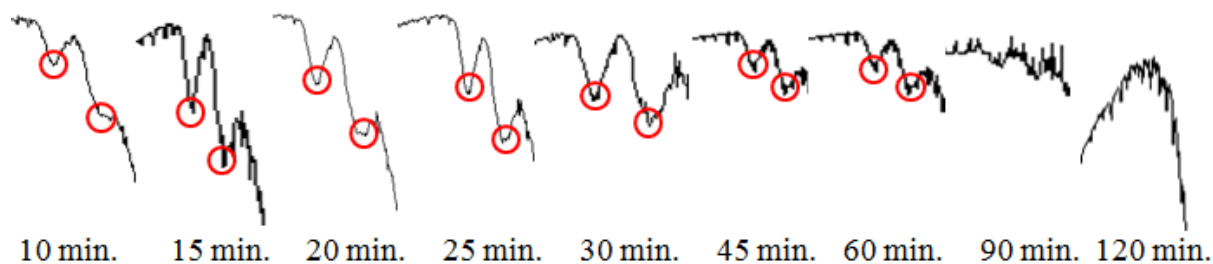


Figura 61 - Destaque da absorção de νNO

4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos, (**Figura 62**), obtidos em forma sólida, apresentaram absorções em 1868 cm^{-1} e em 1861 cm^{-1} para $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ e $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$, respectivamente, indicando assim, a presença de NO. Os complexos não apresentaram absorção no intervalo de 2100 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} , demonstrando a ausência de CO nesses compostos, em que a ligação Metal - C é mais fraca

quando comparada à ligação Metal - NO.⁴⁰ Dessa forma, o estudo teve como foco os complexos $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ e $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$.

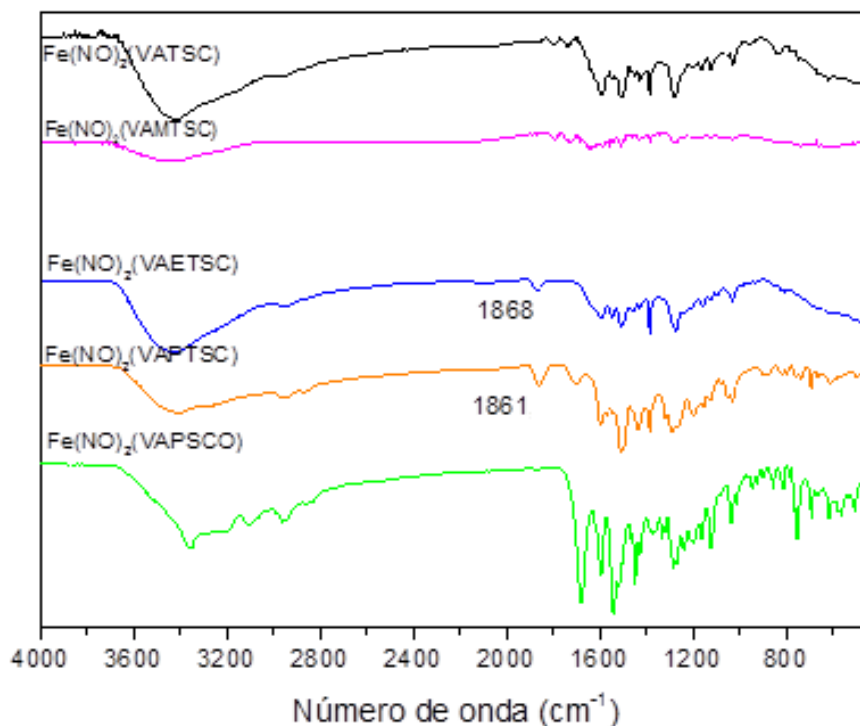


Figura 62 - Comparação dos espectros dos complexos na região do Infravermelho.

A comparação dos espectros entre os complexos e seus respectivos ligantes (**Figuras 63 a 67**) ainda permitiu observar que há ausência de estiramento S-H em torno de 2500 cm^{-1} o que sugere que o átomo de enxofre participa da coordenação. Houve também a presença de estiramento N-H em torno de 3400 cm^{-1} em que há a permanência de um grupo NH após a coordenação. Nota-se que com a coordenação o infravermelho pode apresentar bandas deslocadas para frequências maiores ou menores em comparação com o espectro de absorção dos ligantes, devido à polarizabilidade dos átomos envolvidos e das ligações. Para o grupo tioamida III os complexos indicam uma absorção em torno de 1030 cm^{-1} , entretanto, os ligantes indicam diversas bandas nessa região que podem sugerir além do grupo tioamida a presença de estiramento C-O, ou seja, é incerto apontar em regiões tão ricas em absorção a presença de alguma banda característica a fins de comparação direta com os complexos.

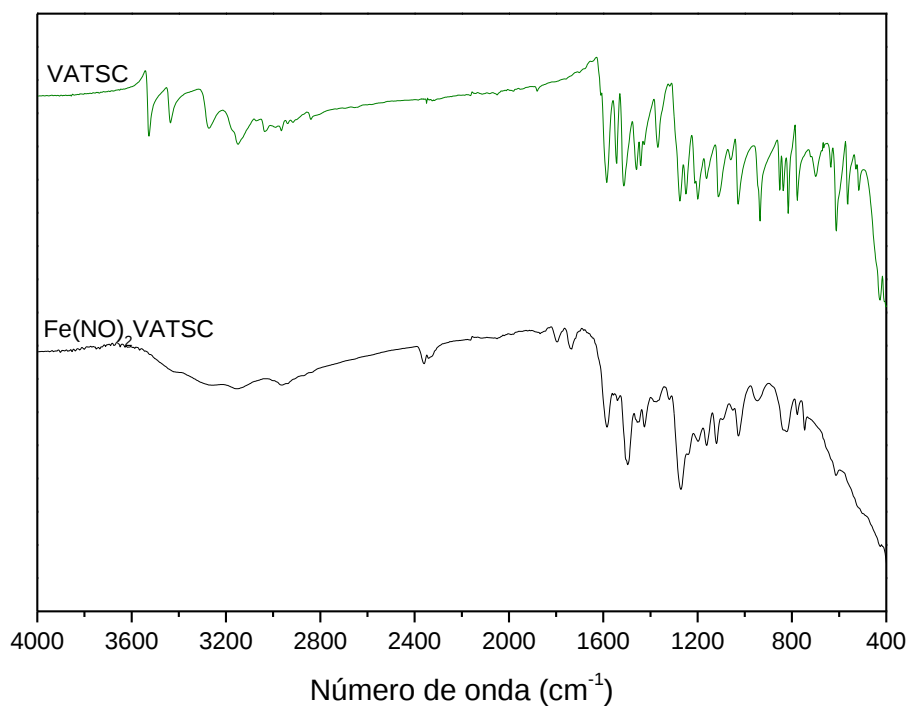


Figura 63 - Comparação dos espectros de VATSC e Fe(NO)₂(VATSC) na região do infravermelho

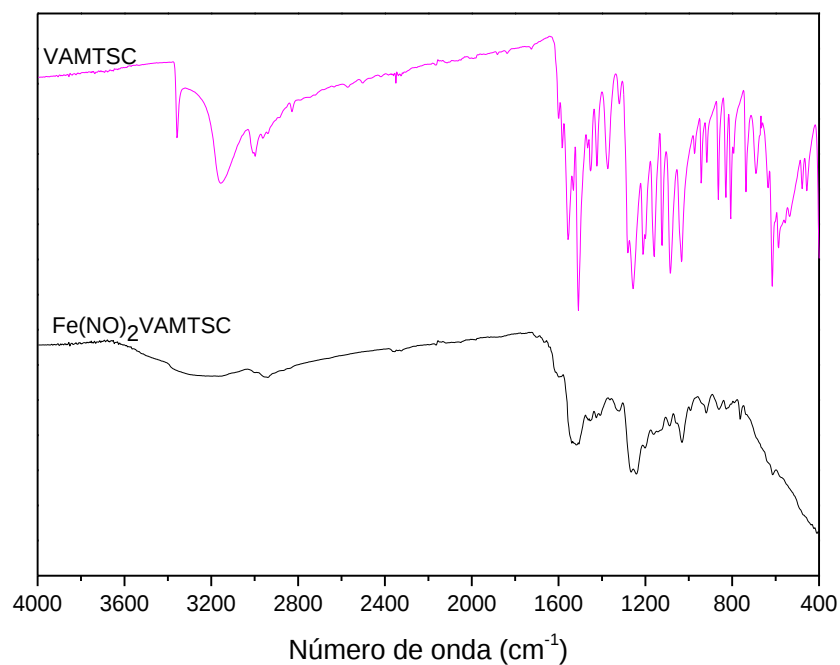


Figura 64 - Comparação dos espectros de VAMTSC e Fe(NO)₂(VAMTSC) na região do infravermelho.

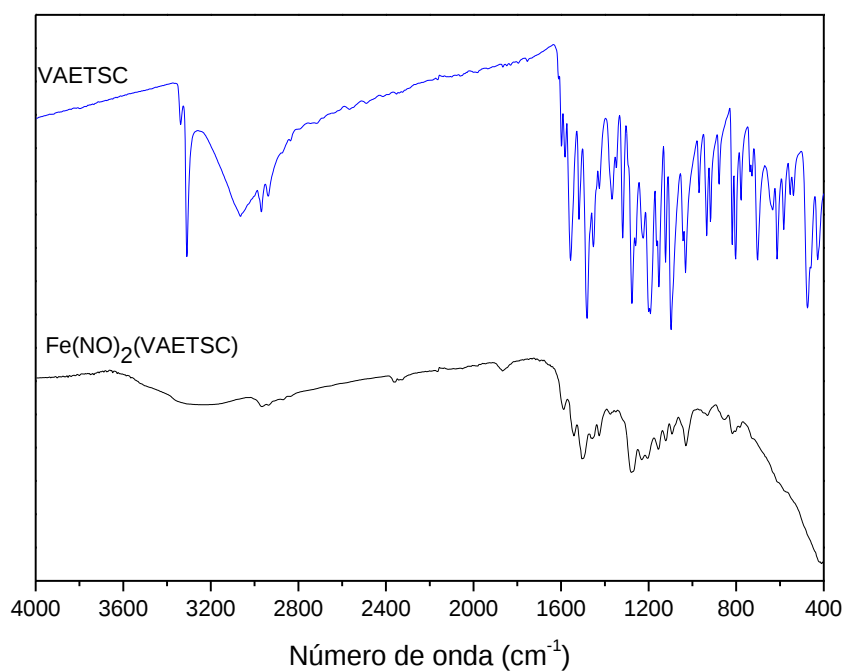


Figura 65 - Comparação dos espectros de VAETSC e Fe(NO)₂(VAETSC) na região do infravermelho.

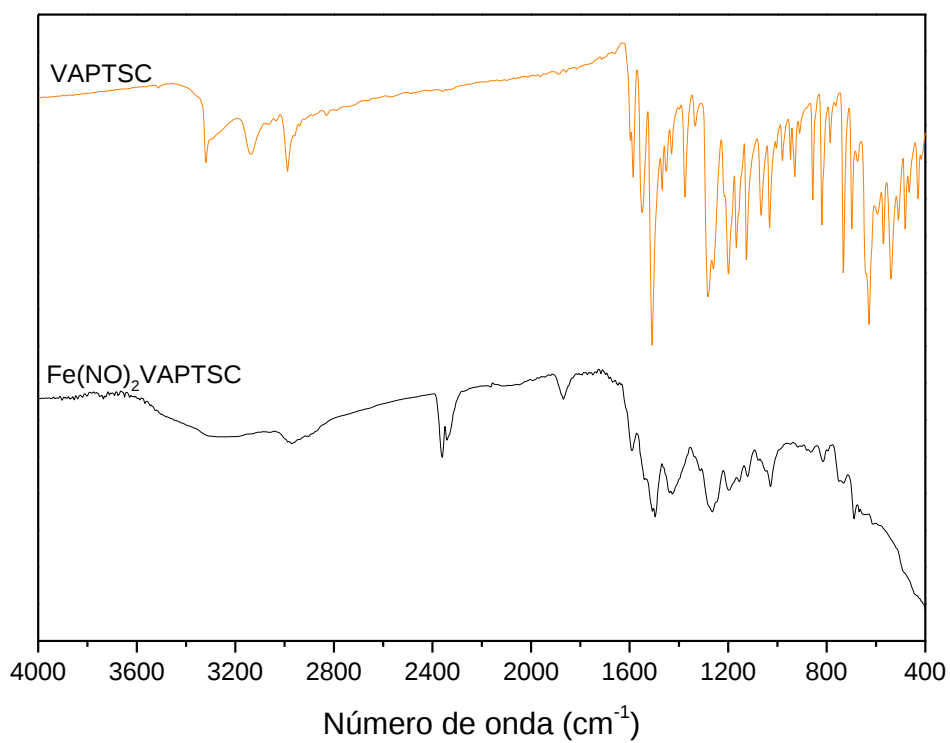


Figura 66 - Comparação dos espectros de VAPTSC e Fe(NO)₂(VAPTSC) na região infravermelho.

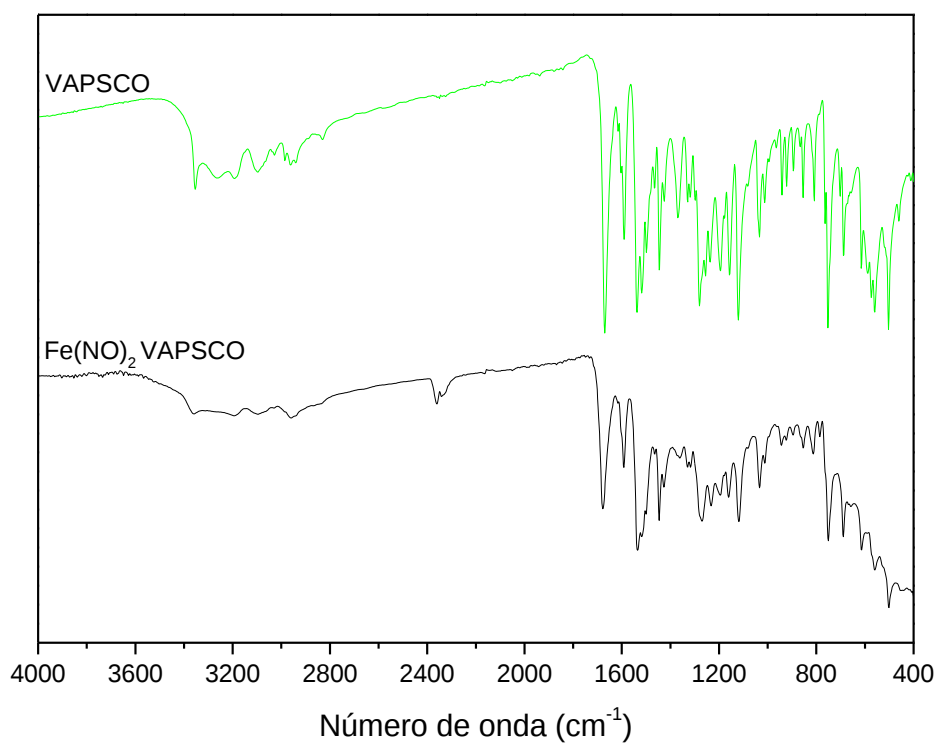


Figura 67 - Comparação dos espectros de VAPSCO e Fe(NO)₂(VAPSCO) na região do infravermelho.

4.2.2 Espectroscopia na região UV/Vis

O espectro de absorção na região do UV/vis para o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ (**Figura 68**), obtido em solução metanólica, mostrou absorções em 303 nm, 328 nm e 342 nm que podem ser atribuídas à presença do ligante. A curva analítica realizada para a absorção de 328 nm indicou um ϵ igual a $13371,56 \text{ cm}^{-1}\text{mol.L}^{-1}$

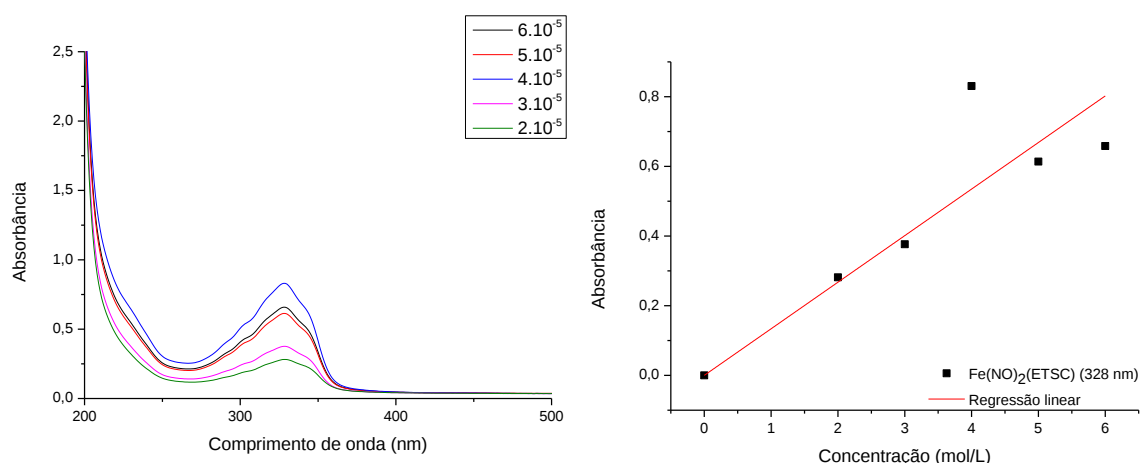


Figura 68 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm (b).

Já o espectro de absorção na região do UV/Vis para o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ (**Figura 69**), obtido em solução metanólica, mostrou absorção em 330 nm que pode ser atribuída à presença do ligante. A curva analítica realizada indicou um ϵ igual a $5202,11 \text{ cm}^{-1}\text{mol.L}^{-1}$

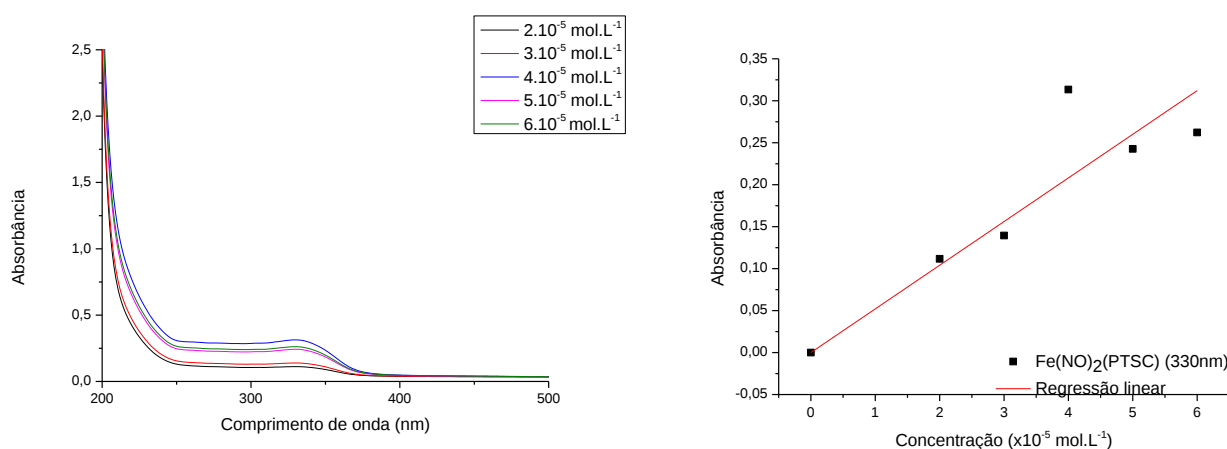


Figura 69- Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 330 nm.

A mudança no valor de ϵ dos ligantes para os complexos sugere uma transferência de carga metal - ligante, sendo que o espectro de complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ aponta para uma instabilidade em solução.

4.2.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas dos compostos (**Figuras 70 a 74**) não indicou o resultado esperado para os complexos. O complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAMTSC})$ apresentou um fragmento de massa 479,2 indicativo da união de dois ligantes VAMTSC enquanto o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ apresentou um fragmento de massa em 358,1 que sugere a presença de ferro com o ligante em questão. Ademais, alguns fragmentos foram encontrados em mais de um complexo, consequentemente, não foi possível uma elucidação clara dessa análise e indicou que a ionização aplicada pode ter fragmentado o composto inviabilizando uma possível elucidação.

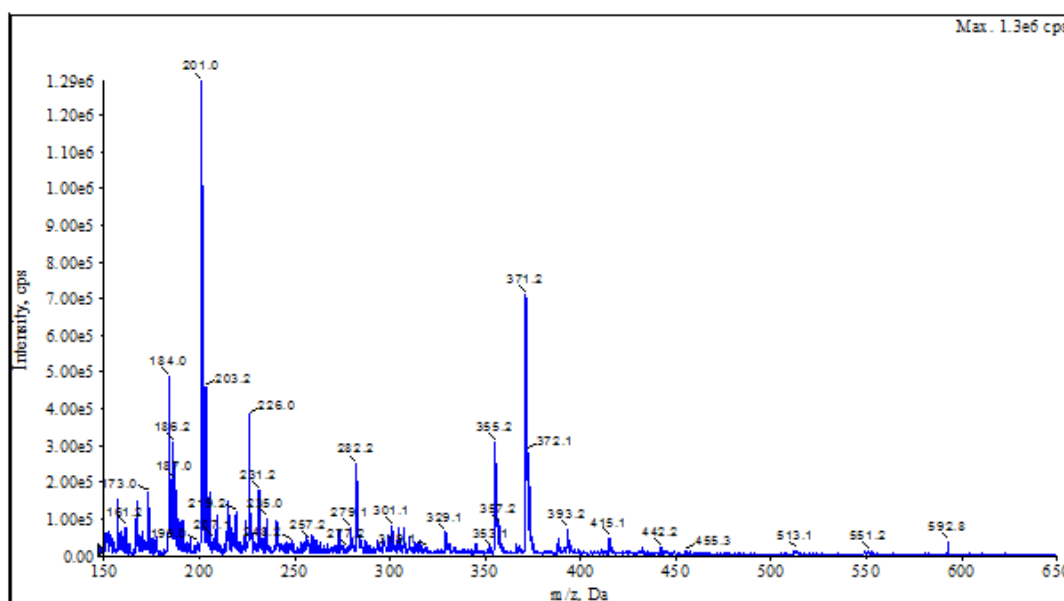


Figura 70 - Espectro de massas obtido por ESI de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VATSC})$ em solução metanólica (modo positivo)

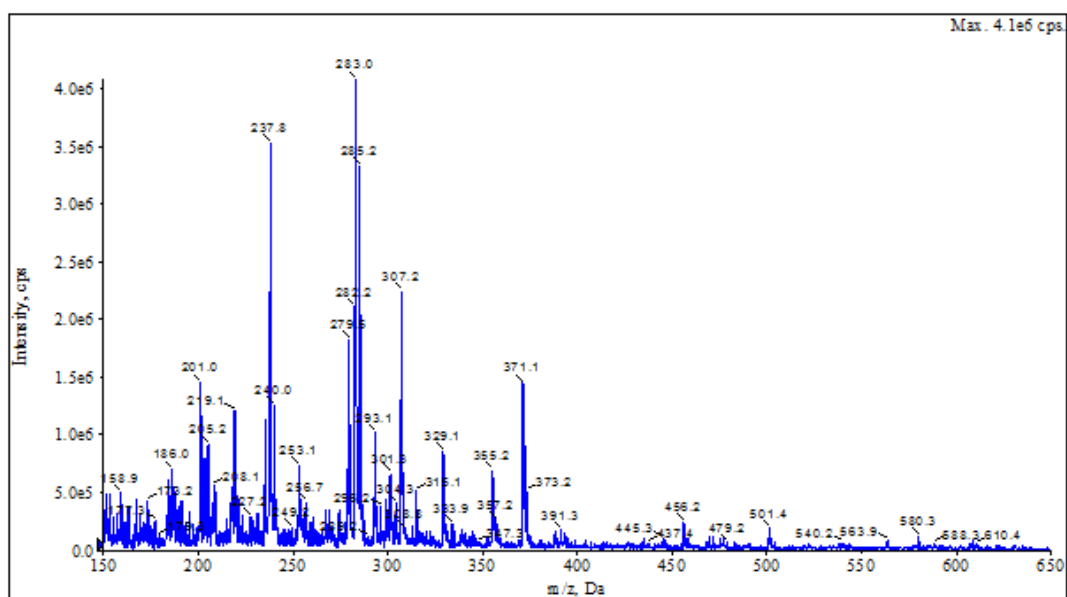


Figura 71 - Espectro de massas obtido por ESI de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAMTSC})$ em solução metanólica (modo positivo)

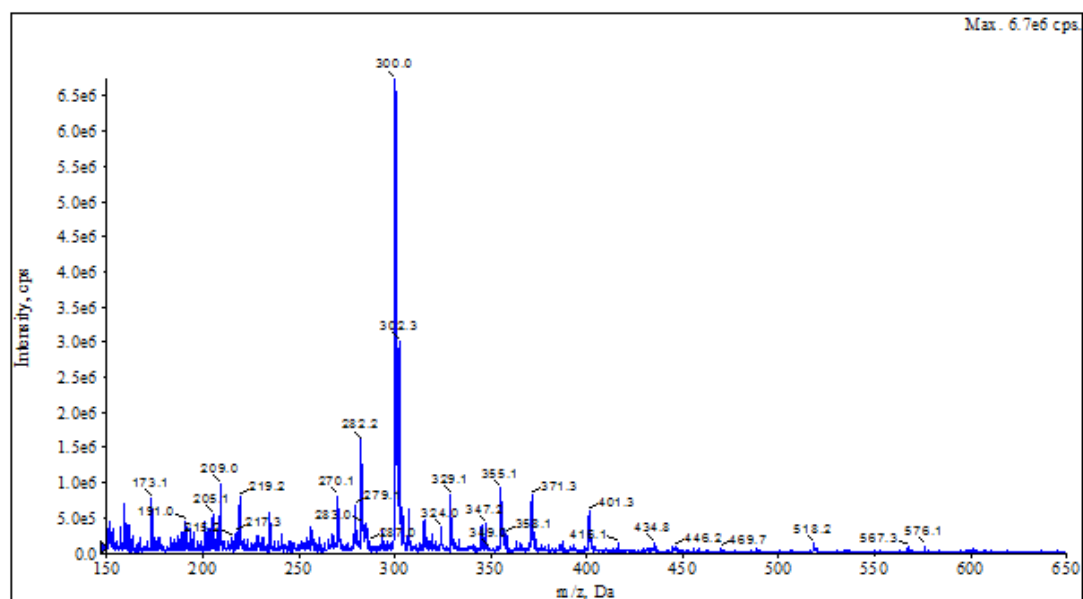


Figura 72 - Espectro de massas obtido por ESI de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ em solução metanólica (modo positivo).

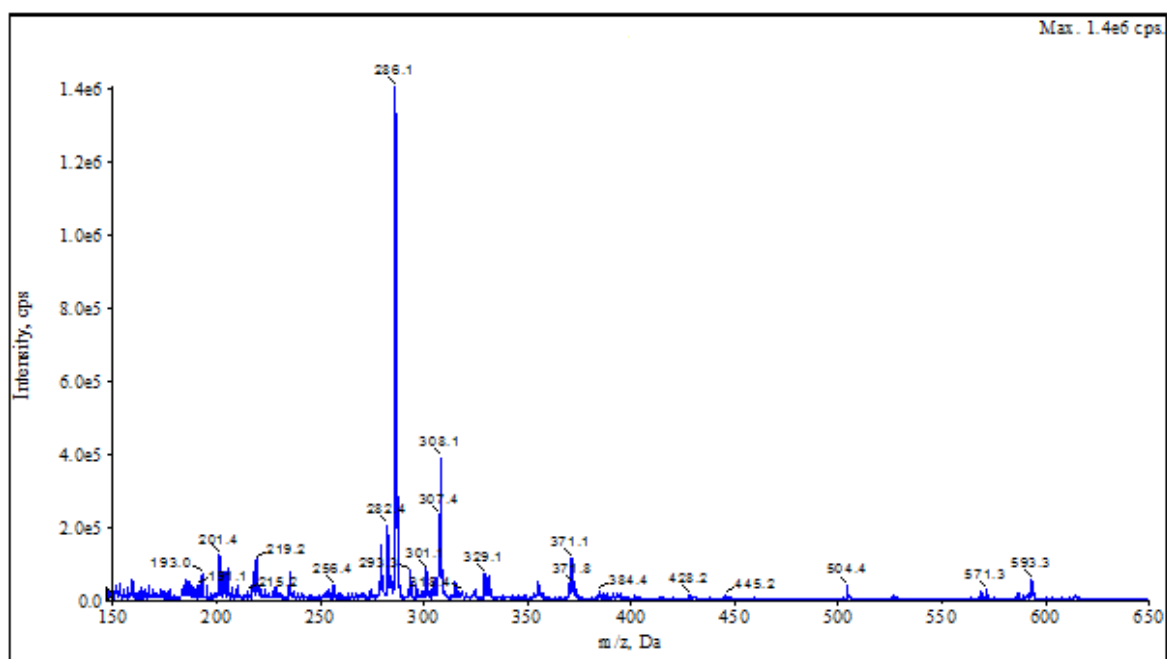


Figura 73- Espectro de massas obtido por ESI de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ em solução metanólica (modo positivo).

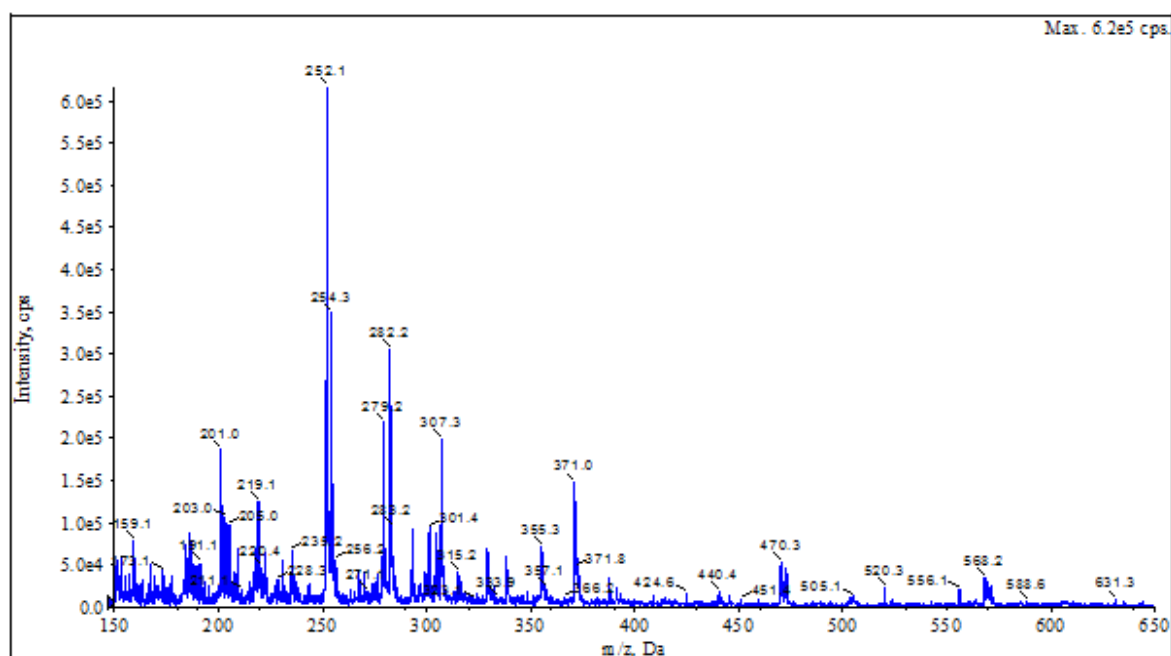


Figura 74 - Espectro de massas obtido por ESI de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPSCO})$ em solução metanólica (modo positivo).

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear

A comparação dos dados de RMN ^1H para o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ e seu respectivo ligante (**Figura 75**) sugeriu que o complexo pode ser instável com o decorrer do tempo e permitiu ainda considerar que a quantidade de complexo formado foi muito abaixo da quantidade de ligante presente na amostra. Outra possível observação para tais espectros seria alguma coordenação com a água presente no DMSO utilizado.

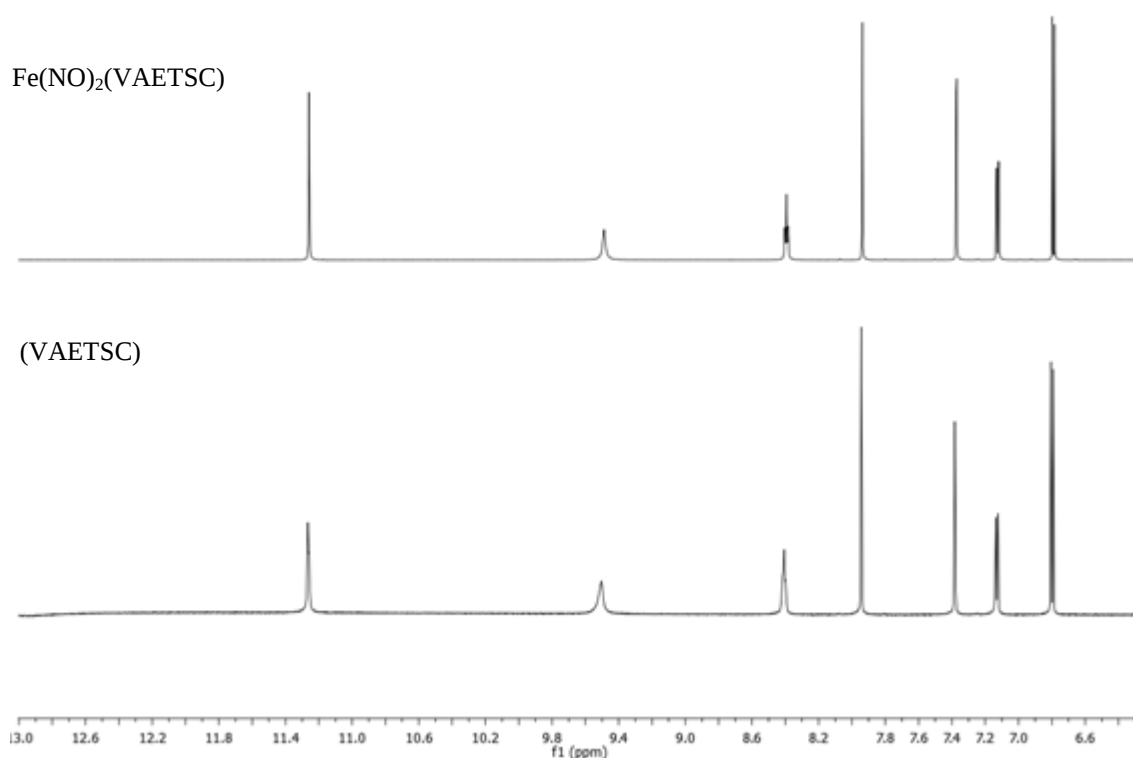


Figura 75 - Espectro comparativo de RMN de ^1H para $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ e VAETSC

4.2.5 Ressonância Paramagnética de Elétron

Os valores de g obtidos da análise dos espectros de EPR dos complexos dinitrosilos, contendo tiossemicarbazonas, estão em torno de 2,042 que podem ter relação com formação de nitrosilos de ferro⁴¹. Os resultados de EPR supracitados em conjunto com os resultados dos espectros de infravermelho indicam que ocorreu formação de dinitrosilos de ferro. Quanto ao espectro do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPSCO})$ apresentou sinal em 2,058 indicando possível mistura de espécies com estrutura não determinada. É importante ressaltar que este foi o único

complexo cujo espectro não apresentou picos referentes ao estiramento Fe-NO. Abaixo, encontra-se os espectros por EPR realizados.

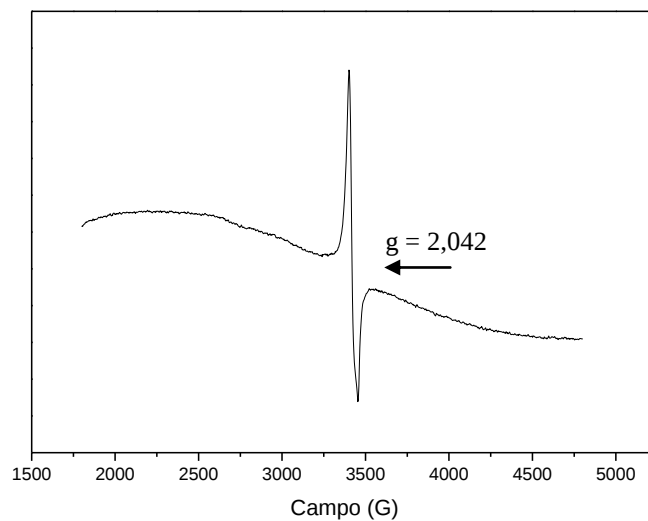


Figura 76 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VATSC})$ em forma sólida.

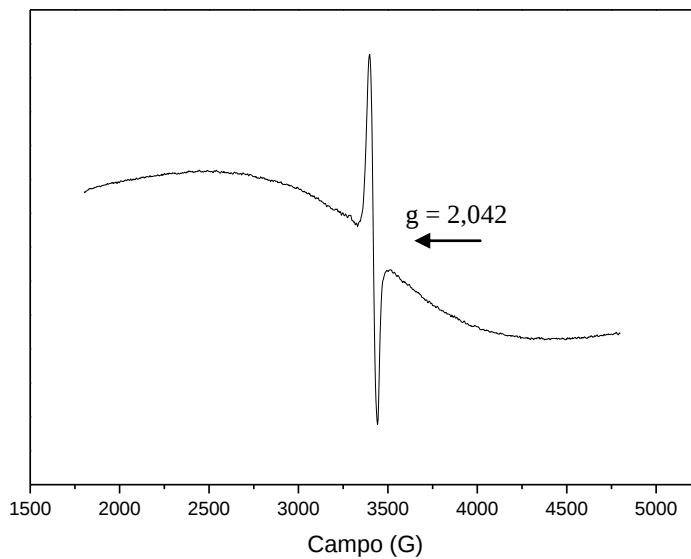


Figura 77 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAMTSC})$ em forma sólida.

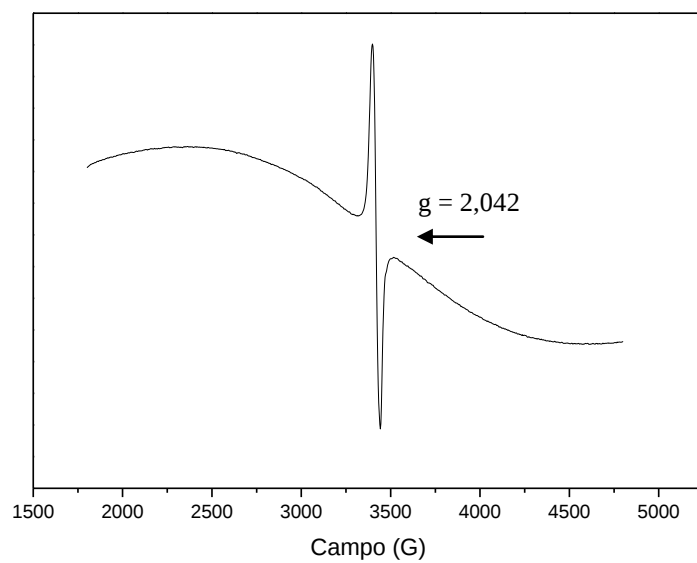


Figura 78 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAETSC})$ em forma sólida.

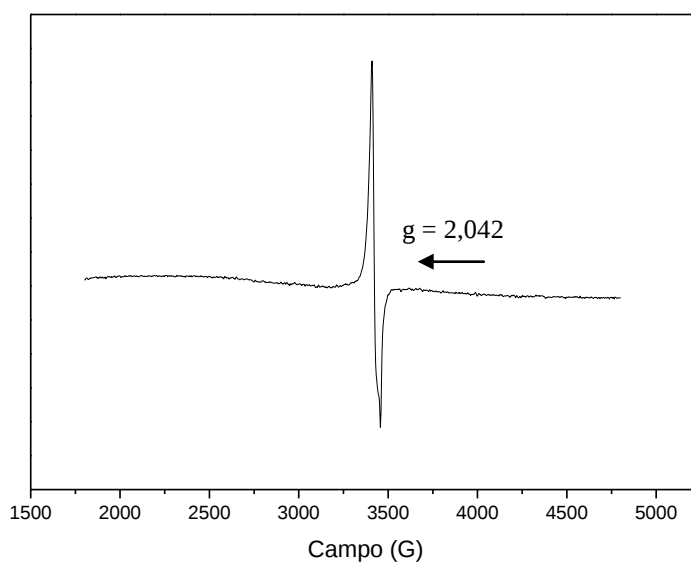


Figura 79 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPTSC})$ em forma sólida.

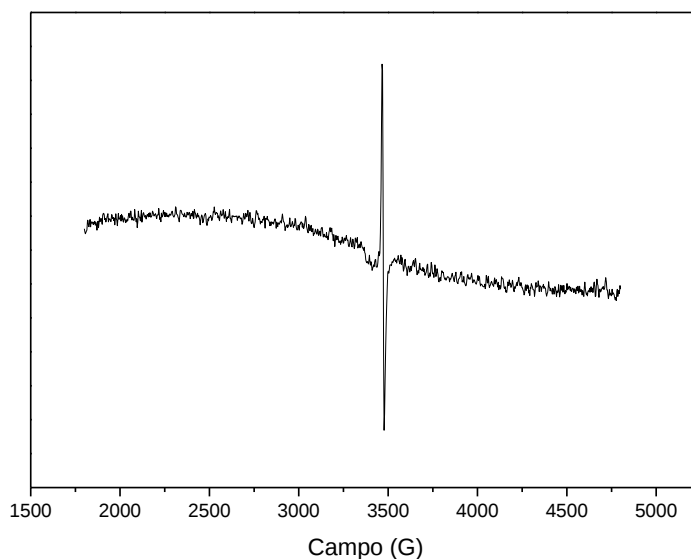


Figura 80 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{VAPSCO})$ em forma sólida.

4.3 Novas propostas de síntese

Devido aos resultados inconclusivos dos espectros de massa, podemos supor que podem ocorrer alterações nas estruturas dos complexos em solução como, por exemplo, liberação de ligante da esfera de coordenação ou alteração na estabilidade do nitrosilo durante a ionização do complexo. Outra possibilidade seria a presença de outras espécies precipitadas em conjunto com o complexo durante o processo de síntese.

Portanto, devido ao exposto acima, foram propostas duas novas rotas de síntese dos complexos: uma das propostas com excesso de metal (excesso do complexo de partida) e a outra com excesso do ligante VAETSC. O complexo com excesso de metal contém a proporção 2 ($\text{Fe}(\text{NO})_2$) : 1(VAETSC). Neste caso, acreditamos que ao final da síntese o complexo de partida que não reagiu seria facilmente eliminado devido sua volatilidade. Já o complexo com excesso de ligante possui a proporção inversa. Ambos os complexos foram sintetizados com o uso de THF durante 30 minutos. O complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (VAETSC) (Exc. Metal) apresentou uma coloração preta, enquanto o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) se mostrou marrom.

4.3.1 Espectro de absorção na região do Infravermelho

O espectro na região do infravermelho (**Figura 81**) indicou a presença da absorção em torno de 1850 cm^{-1} , sugestiva de Fe - NO e as absorções características do ligante, conforme observado abaixo:

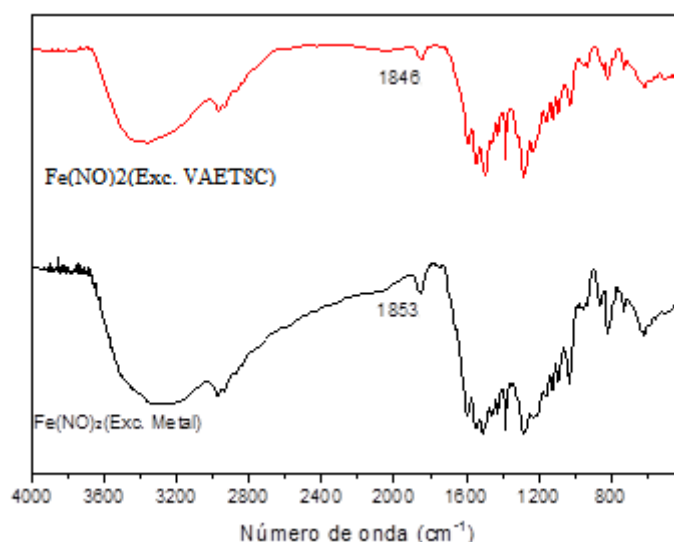


Figura 81 - Espectroscopia na região do infravermelho dos complexos sintetizados.

4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear

Para o complexo $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. VAETSC})]$ foram realizados RMN de ^1H , DEPT, HSQC e HMBC em clorofórmio deuterado, devido a possível coordenação apresentada com DMSO em complexos e a presença de água no mesmo.

O espectro de RMN de ^1H do complexo (**Figura 82**) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo um duplete em δ 6,94 com constante de acoplamento equivalente a 8,2 Hz, um duplo duplete em δ 7,13 ($J = 8,2$ e 1,9 Hz) e um duplete em δ 7,77 com $J = 1,9$ Hz. Foi observado um simpleto em δ 8,90, referente, ao hidrogênio da ligação N-H de número 2 e um triplete em δ 7,34, associado, ao hidrogênio de número 4. Os sinais em δ 7,68 e em δ 5,90 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios das ligações $\text{CH}=\text{N}$ e $\text{O}-\text{H}$. Um simpleto em δ 3,96 corresponde aos hidrogênios presentes em $\text{O}-\text{CH}_3$. O quinteto em δ 3,78 corresponde aos hidrogênios metilênicos e o triplete em δ 1,33 refere-se aos hidrogênios metílicos.

Com o experimento de DEPT (**Figura 83**) foi possível listar sinais de carbono e atribuí-los como: seis sinais relativos a carbonos de anel aromático, onde três são metínicos (δ 108,22; 114,77; 122,75) e três sinais (δ 125,46; 147,06; 148,55) correspondem, respectivamente, ao C₆, ao carbono ligado ao grupo metoxila e, por fim, a hidroxila. Outros sinais de C (δ 14,68; 39,57; 56,19; 142,77; 177,23), referem-se respectivamente, a metila, ao grupo CH₂, ao carbono do grupo metoxila, ao C₅ e ao carbono da ligação C=S (**Tabela 9**).

Dos resultados obtidos, observa-se que houve uma alteração no sistema da amina próxima ao etil, ou seja, na região de interesse para a complexação. Através do espectro de RMN de ¹H, percebe-se a presença de grupos metínicos sobrepostos, e com o experimento TOCSY 1D foi possível irradiar cada grupo metínico do sistema, ou seja, pôde-se irradiar o sinal em δ 3,78 e em δ 3,74 e verificar a alteração do deslocamento químico NH (4) de δ 7,34 para δ 1,85, sugerindo uma complexação nessa região. Com os experimentos por RMN realizados, percebeu-se que se os espectros fossem feitos após horas do preparo da solução, ocorriam mudanças nas frequências de deslocamento e alargamento de bandas. Além disso, a solução passava a apresentar algum precipitado. Isso nos sugere que em solução há uma instabilidade do complexo formado, possivelmente, por degradação da estrutura e alteração do nox do ferro.

Tabela 9 - Dados compartivos de RMN de ^1H e ^{13}C DEPT 1D entre VAETSC e $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ (Exc.VAETSC)].

Nº	VAETSC		$\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. Metal})$	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, Mult, J (Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, Mult, J (Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
1				
2	11,26 (1H; s)	-	8,90 (1H; s)	-
3		176,31		177,23
4	8,39 (1H; t; 5,9 Hz)	-	7,34 (1H; t; 5,9 Hz)	-
5	9,49 (1H; s)	142,58	7,68 (1H; s)	142,77
6	-	122,60	-	125,60
7	7,37 (1H; d; 1,9)	110,12	7,17 (1H; d; 1,9)	108,22
8	-	147,98	-	147,06
9	-	148,79	-	148,55
10	6,79 (1H; d; 8,2)	115,43	6,94 (1H; d; 8,2)	114,77
11	7,13 (1H; dd; 1,9 e 8,2)	121,86	7,13 (1H; dd; 1,9 e 8,2)	122,75
12	3,83 (3H; s)	55,87	3,96 (3H; s)	56,19
13	7,94 (1H; 1s)	-	5,90 (1H; 1s)	-
14	3,59 (2H; qd; 5,9 e 7,1)	38,23	3,78 (2H; m)	38,23
15	1,15 (3H; t; 7,1 e 5,9Hz)	14,78	1,32 (3H; t; 7,1 e 5,9Hz)	14,68

^aEspectros obtidos em CDCl_3 , 600/150MHz

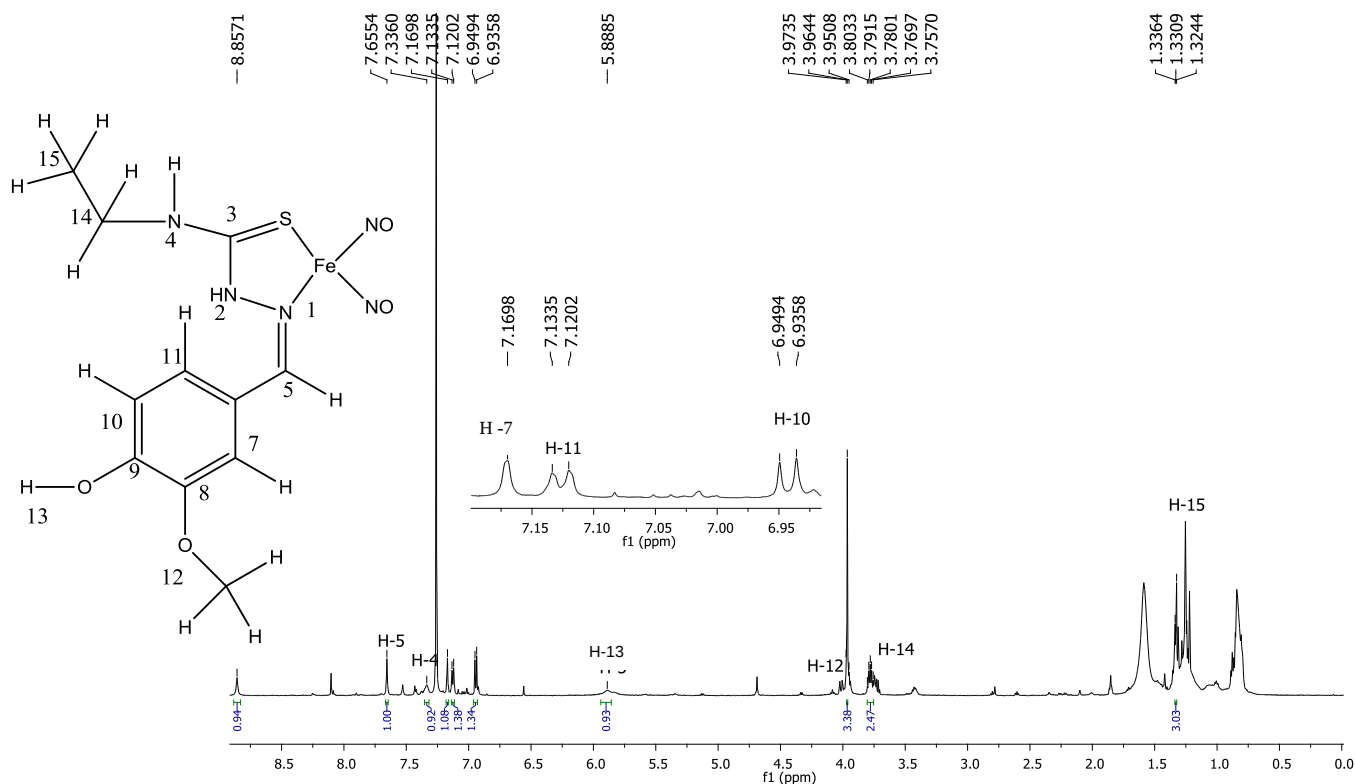


Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) (CDCl_3 , 600 MHz).

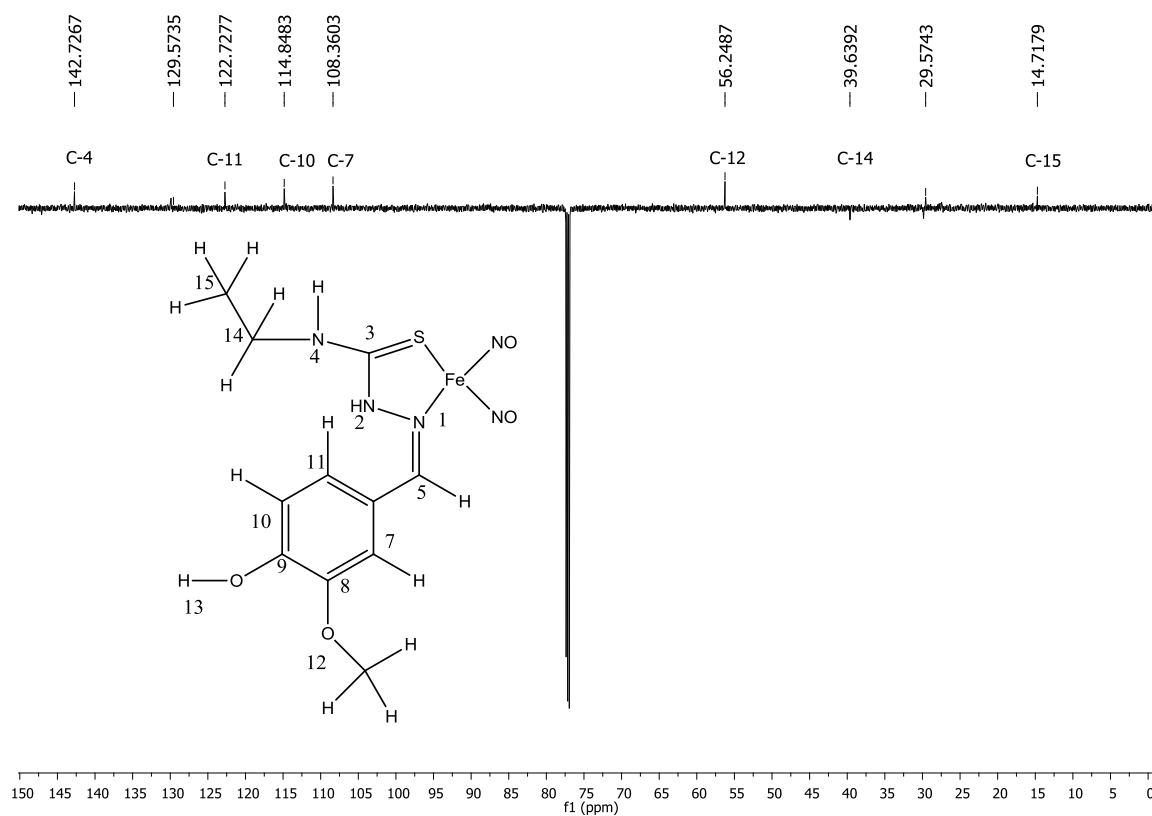


Figura 83 - Espectro de RMN ^{13}C de $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) (CDCl_3 , 600 MHz).

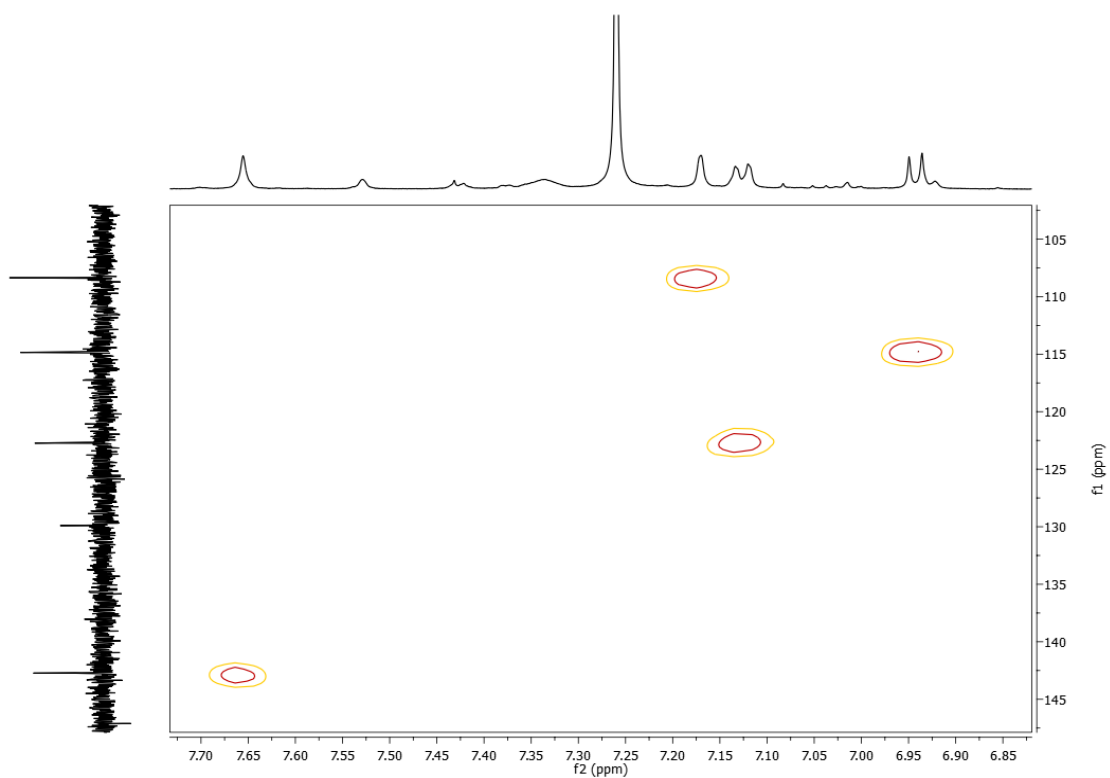


Figura 84 - Espectro de RMN de HSQC ^1H - ^{13}C - J_{CH} de $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) (CDCl_3 , 600 e 150 MHz).

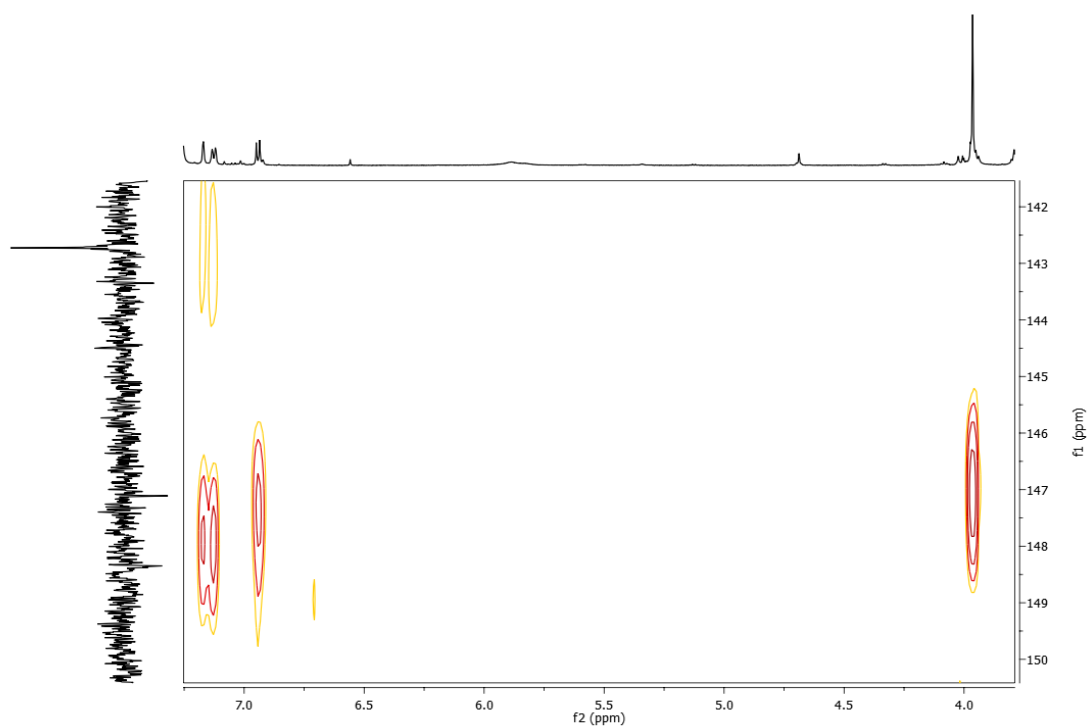


Figura 85- Espectro de RMN de HMBC ^1H - ^{13}C de $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) (CDCl_3 , 600 e 150 MHz).

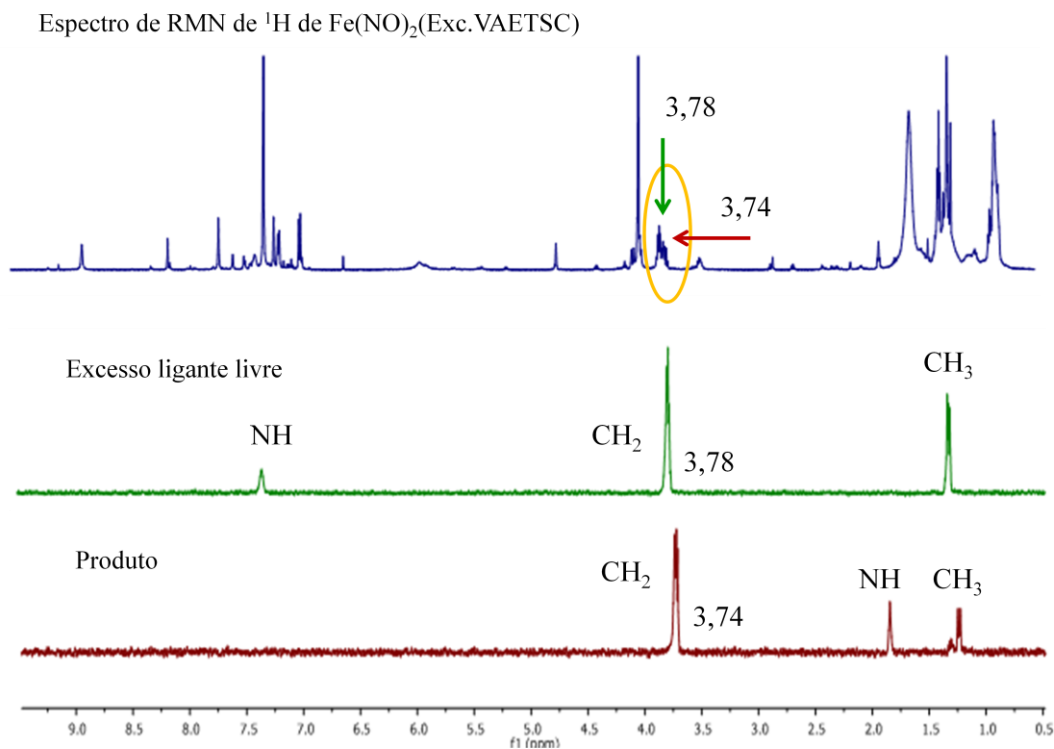


Figura 86 - Espectros de RMN de ^1H comparativos com auxílio de TOCSY 1D da amostra $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) (CDCl_3 , 600 MHz).

4.3.3 Espectroscopia na região UV/Vis

O espectro de absorção na região do UV/vis para o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2$ (Exc. VAETSC) (**Figura 87**), obtido em solução metanólica, mostrou absorções em 301 nm, 328 nm e 344 nm que podem ser atribuídas à presença do ligante. A curva analítica realizada para a absorção em 328 nm indicou um ϵ igual a $23924,64 \text{ cm}^{-1}\text{mol.L}^{-1}$.

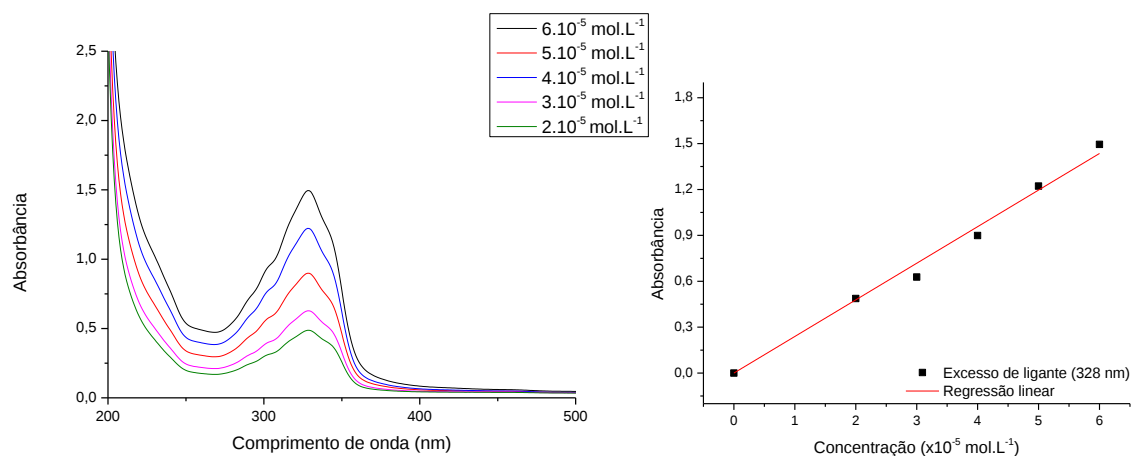


Figura 87 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc.VAETSC})$ (a) E Curva analítica obtida para a banda principal em 328 nm (b).

Já o espectro de absorção na região do UV/Vis para o complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. Metal})$ (**Figura 88**), obtido em solução metanólica, mostrou absorção em 329 nm que pode ser atribuída à presença do ligante e apresentou um ϵ igual a $25250,78 \text{ cm}^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ para tal absorção.

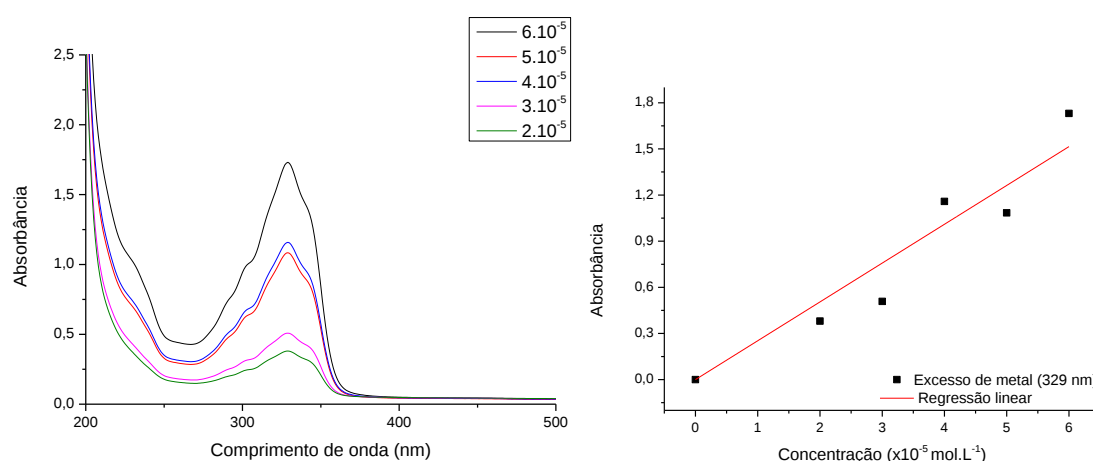


Figura 88 - Espectro eletrônico de absorção na região UV - Vis: Espectro de $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc.Metal})$ (a) e Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm (b).

Sugere-se a ocorrência de transferência de carga do metal para o ligante pelos valores de ϵ apresentados.

4.3.4 Espectrometria de massas

A molécula protonada observada no espectro de massas indicou uma m/z de 370,9 (Figuras 89 e 90), sendo compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{15}O_4N_5SFe$ proposta, confirmando a síntese do complexo pelas duas alternativas escolhidas de preparo.

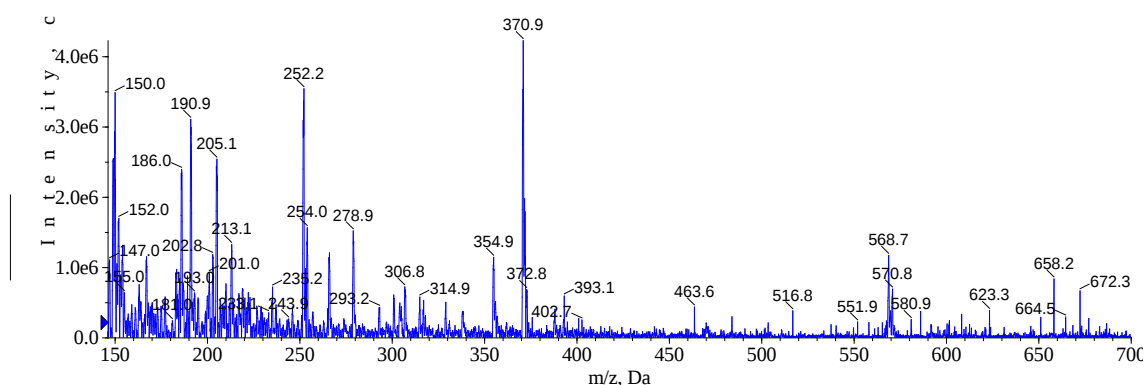


Figura 89 - Espectro de massas obtido por ESI de $Fe(NO)_2$ (Exc. VAETSC) em solução metanólica (modo positivo).

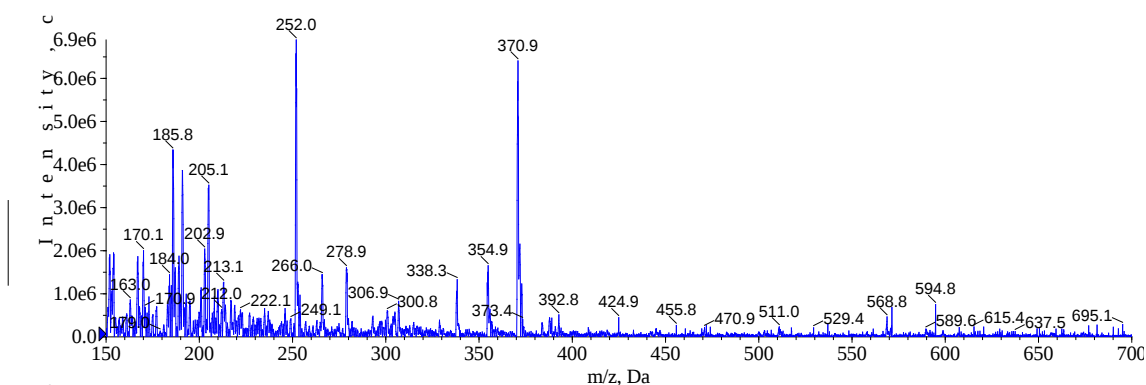


Figura 90 - Espectro de massas obtido por ESI de $Fe(NO)_2$ (VAETSC) (Exc. Metal) em solução metanólica (modo positivo).

4.3.5 Ressonância paramagnética de elétron

Os valores de g obtidos da análise dos espectros de EPR (**Figuras 91 e 92**) de ambos os complexos $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. Metal})]$ e $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. VAETSC})]$ estão em torno de 2,042 confirmando a formação de dinitrosilos de ferro.

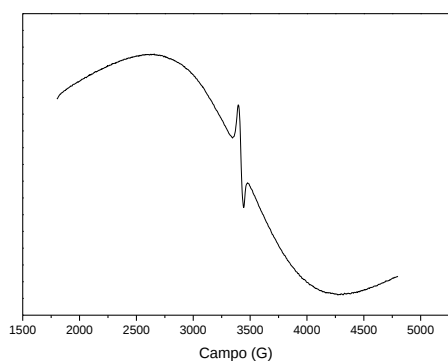


Figura 91 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. Metal})$ em forma sólida

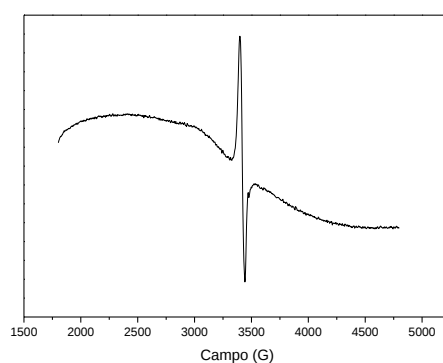


Figura 92 - Espectro de EPR do complexo $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Exc. VAETSC})$ em forma sólida

5 CONCLUSÃO

O estudo permitiu a caracterização espectroscópica de alguns compostos derivados da vanilina e possibilitou um maior conhecimento sobre o estudo das tiosemicarbazonas e semicarbazonas através dos ensaios biológicos. As análises adotadas para caracterização dos ligantes orgânicos foram Análise Elementar, Espectroscopia no UV-Vis, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas. Os ligantes também foram avaliados através de ensaio citotóxico frente a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) e bacteriano por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo que para essa última, os resultados de inibição foram relevantes e demonstraram, de forma condizente com a literatura, a variedade de uso para a classe de semicarbazonas e tiosemicarbazonas.

A metodologia do complexo precursor (DNIC) foi melhorada a partir de alterações no tempo, na temperatura e nos meios utilizados na metodologia anterior, possibilitando uma obtenção mais eficaz.

Após análise dos resultados obtidos com a formação dos primeiros complexos foram propostas outras duas rotas de síntese que resultaram em dois complexos, os quais, foram analisados através de técnicas já mencionadas que indicaram o alcance do complexo proposto em forma sólida. Ressalta-se que mais estudos são necessários, pois em solução o complexo demonstrou ser instável por conta de O_2 ou pela presença de luz, como também há a possibilidade de haver a liberação de NO, fazendo com que não seja possível concluir a estrutura adotada em solução.

REFERÊNCIAS

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca, 2011.
2. RODRIGUES, J.S.; FERREIRA, N.M. Caracterização do Perfil Epidemiológico do Câncer em uma Cidade do Interior Paulista: conhecer para intervir. **Rev. Bras. Câncer**, v. 56, n. 4, p. 431-441, 2010
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2018.
4. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. O que é o câncer? Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 . Acesso em: 06 jun. 2018.
5. SOLOMON, E.; BORROW, J.; GODDARD, A. D. Chromosome Aberrations and Cancer. **Science**, v. 254, p. 1153-1160, 1991.
6. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell**, n. 144, 2011.
7. BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio: reverter o câncer. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 184, 2002.
8. BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. Metastatic Cancer Cell. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 3, p. 221-247, 2008.
9. GALBIATTI, A. L. S.; et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239-247, 2013.
10. GALBIATTI, A. L. S.; et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239-247, 2013.
11. BLINMAN, P.; et al. Preferences for cancer treatments: an overview methods and applications in oncology. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1104-1110, 2012.
12. SHAHEEN, F.; et al. *In vitro* assessment of cytotoxicity, anti-inflammatory, antifungal properties and crystal structures of metallacyclic palladium(II) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 695, p. 315-322, 2010.
13. ANG, W. H.; et al. Rational design of platinum (IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. **Journal American Chemical Society**, v. 127, p. 1382-1383, 2005.

14. GODWIN, A. K.; et al. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 3070-3074, 1992.
15. QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, 1999.
16. WU, S.; et al. Water-soluble dinitrosyl iron complex (DNIC): a nitric oxide vehicle triggering cancer cell death via apoptosis. **Inorganic Chemistry**, v. 55, p. 9383-9392, 2016.
17. ALBANO, V. G. et al. Stereochemistry of tetrahedral complexes of group VIII metals. Crystal and molecular structures of dinitrosylcarbonyltriphenylphosphineiron, $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{CO})(\text{PPh}_3)$, and of dinitrosylbis(triphenylphosphine)iron, $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{PPh}_3)_2$. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 413-422, 1974.
18. BRYAR, T. R.; EATON, D. R. Electronic configuration and structure of paramagnetic iron dinitrosyl complexes. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 1917-1926, 1992.
19. ZANETTI, R. D. **Dinitrosilos de ferro contend tiadiazol ou tiosemicarbazona derivada do cinamaldeído: síntese, caracterização e potencial aplicação antitumoral**. 96f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2018.
20. MINGOS, D. M. P. Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry , Biochemistry and Medicine I. Oxford: Structure and Bonding, 2014.
21. DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção da vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, 2005.
22. LIRD, P.; RAPAMONGKOL, K.; et al. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 57-65, 2005.
23. AL ASMARI, A.; et al. Vanillin abrogates ethanol induced gastric injury in rats via modulation of gastric secretion, oxidative stress and inflammation. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 105-113, 2016.
24. ALI, S. M. M.; et al. In vivo anticancer activity of vanillin semicarbazone. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 438-442, 2012.

25. SHAHRIAR, S. M. S.; et al. In vivo anticancer activity of vanillin, benzophenone and acetophenone thiosemicarbazones on swiss albino mice. **Journal of Costa Life Medicine**, v. 2, n. 10, p. 811-816, 2014.
26. MAIA, P. I. da S. et al. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: synthesis, characterization, crystal structures and anti-mycobacterium tuberculosis activity. **Polyhedron**, v. 28, n. 2, p. 398-406, 2009.
27. PELOSI, G. et al. Antiretroviral activity of thiosemicarbazone metal complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8765-8769, 2010
28. SOARES, M. A. et al. N4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and investigation on the mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3396-3409, 2012.
29. THOMAZELLA, N.A. Compostos de paládio (II) contendo ligantes N,S-quelantes: síntese, caracterização e investigação da atividade biológica. 96f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2016.
30. TENÓRIO, R. P. et al. TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.
31. SYTWU, K. L. Synthesis and Characterization of Novel Dinitrosyl-Iron Complexes of bridged bis-phospine ligands. [s.l.] California State University, Long Beach, 2014.
32. CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
33. RODRÍGUEZ RIOBÓ, R. Complejos metálicos con tiosemicarbazonas derivadas de la 2-pirazinaformamida. [s.l.] Universidade de Santiago de Compostela, 2007.
34. ISSA, R. M.; KHEDR, A. M.; RIZK, H. ¹H NMR , IR and UV / VIS Spectroscopic Studies of Some Schiff Bases Derived From 2-Aminobenzothiazole and 2-Amino-3-hydroxypyridine. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 55, n. July, p. 875–884, 2008.
35. Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R., Introdução à Espectroscopia, Cengage Learning, 2010.

36. SINGHT, B.; THAKUR, K. P. Thioamide Bands and Nature of Bonding - II. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 36, n. April 1973, p. 1735–1737, 1974.
37. BRAGA, S. F. P.; et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, apr./jun., 2016.
38. NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry. 6^a Ed.
39. DIEGO, D. A. Synthesis and Characterization of Iron Dinitrosyl Complexes with Nitrogen Containing Chelating Ligands. [s.l.] University of California, 2014.
40. MCCLEVERTY, J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 403–418, 2004.
41. TRACRI . BRYARAN D DONALDR. EATON, CAN. J. CHEM. VOL. 70, 1992; Pereira, J.C.M.; Iretskii, A. V.; Han, Rui-Min; Ford, P. C. **J. Amer. Chem Soc.** 2015, 137, 328-336.
42. MINGOS, D. M. P. Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry , Biochemistry and Medicine I. Oxford: Structure and Bonding, 2014.
43. DE MARIA, F. et al. The specific interaction of dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex, a natural NO carrier, with the glutathione transferase superfamily: Suggestion for an evolutionary pressure in the direction of the storage of nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 42283–42293, 2003.
44. NETO, F. A. P. Estudo teórico da natureza da ligação M-NO do complexo trans-[M(NO)(Oxa-aza)L]ⁿM=Rh⁺²; L=Cl⁻, H₂O ou CN⁻ e OXA-AZA = OXAAZAMACROCÍCLICO). 73f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Piauí, Teresina-PI, 2017.
45. SIQUEIRA, L. P. R.; et al. Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 170, p. 237-260, 2019.
46. RATHBONE, D. L.; et al. Thiosemicarbazones active against *Clostridium difficile*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 1708-1711, 2008.

