

## 1. Introdução

Tiossemicarbazonas apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e, particularmente, na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo de ação [1,2].

Tiossemicarbazonas apresentam, entre outras, atividades como agentes antitumorais, antivirais, antifúngicos, antibacterianos e antimaláricos [3]. As tiossemicarbazonas são hoje a segunda classe mais importante de compostos antitumorais depois dos derivados do *cis*-diaminodicloroplatina(II), o cisplatina [4]. A equação de obtenção e a estrutura genérica das tiossemicarbazonas estão representadas na Figura 1.1.

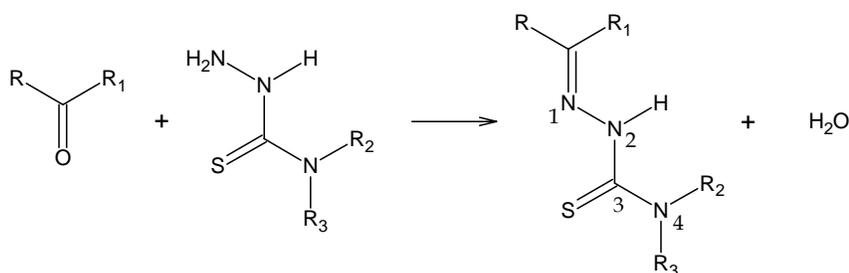


Figura 1.1 - Equação genérica de obtenção das tiossemicarbazonas (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = H, grupos arila ou grupos alquila)

Nesse trabalho, estamos interessados no estudo de tiossemicarbazonas com atividade antitumoral.

O câncer é basicamente uma doença de células, caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação celular. As células que sofrem transformação neoplásica proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes (metástase).

Alguns tipos de neoplasias respondem pouco aos agentes quimioterápicos existentes e a maioria dos fármacos antineoplásicos é altamente tóxica para o paciente, o que justifica a busca por novas drogas.

Tiossemicarbazonas  $\alpha$ (N)-heterocíclicas (Figura 1.2) são muito estudadas em razão de sua comprovada ação antitumoral [5]. A atividade antileucêmica da

2-formilpiridina tiossemicarbazona (H2Fo4DH) foi demonstrada já em 1956 [6]. French e colaboradores [7,8] formularam hipóteses a respeito do modo de ação das tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas e verificaram que esses compostos estariam atuando como agentes quelantes tridentados.

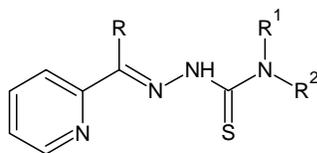


Figura 1.2 - Estrutura genérica das tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, grupos arila ou grupos alquila)

Variações estruturais podem conduzir a modificações significativas na atividade biológica e alguns estudos das relações estrutura-atividade são encontrados na literatura [5]. Sabe-se, por exemplo, que tiossemicarbazonas derivadas da piridina contendo grupos volumosos como substituintes no nitrogênio terminal apresentam maior atividade antitumoral que aquelas contendo o grupo NH<sub>2</sub> [9]. Sabe-se ainda que tiossemicarbazonas tridentadas são mais ativas que seus análogos bidentados [10].

Desse modo, nesse trabalho estudamos tiossemicarbazonas tridentadas, derivadas de 2-piridinoformamida (H2Am4R, Figura 1.3), não substituída ou contendo os substituintes metila, etila ou fenila no nitrogênio terminal. Nessas tiossemicarbazonas um grupo amino substitui um alquil ou aril em C(7). Essa modificação estrutural levou a uma melhora da solubilidade em água desses compostos, em relação a análogos tais como 2-formil (C(7)-H), 2-acetil (C(7)-CH<sub>3</sub>) e 2-benzoilpiridina (C(7)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) que possuem atividade *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais humanas [11], mas que por tratar-se de compostos insolúveis em água, são menos promissores para testes *in vivo*.

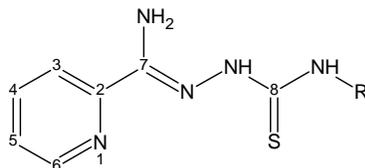


Figura 1.3 - Estrutura de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas (H2Am4R, R = H, Me, Et, Ph)

O mecanismo de ação biológica das tiossemicarbazonas, em muitos casos, envolve seus complexos metálicos, o que torna o estudo destes tão, ou mais

importante que o estudo dos ligantes livres. Além disso, em alguns casos o complexo é mais ativo do que o ligante ou o complexo pode ativar o ligante como agente citotóxico e fazer decrescer a resistência celular à droga [9]. Alguns efeitos colaterais causados pelos ligantes podem também ser diminuídos pela complexação [5].

Há vários exemplos na literatura de complexos metálicos de tiossemicarbazonas de grande importância farmacológica como aqueles de Pd(II) e Pt(II) de fenilacetaldéido tiossemicarbazona que apresentam atividade citotóxica em células tumorais resistentes ao cisplatina [12]. Além disso, a 3-aminopiridina-2-carboxaldeído thiosemicarbazona (Triapina®, Figura 1.4) parece ser hoje a droga antileucêmica mais promissora, encontrando-se, atualmente, em ensaios clínicos fase II, realizados pelos laboratórios Vion. A forma ativa dessa droga é seu complexo de Fe [1,2,13]. Esse composto age inibindo a enzima ribonucleotídeo difosfato redutase (RDR).

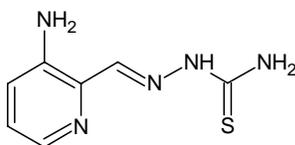


Figura 1.4 - Estrutura da 3-aminopiridina-2-carboxaldeído thiosemicarbazona (Triapina®)

Alguns quelantes de ferro são poderosos inibidores da RDR, como é o caso das tiossemicarbazonas. Alterações na atividade da RDR podem modificar a velocidade de mutação espontânea das células. Um aumento na atividade da enzima pode estar associado a doenças e, em particular ao câncer, tornando-a um alvo atraente para a quimioterapia. Esta enzima alostérica consiste de duas subunidades, R1 e R2, mostradas na Figura 1.5a. Na subunidade R1 encontram-se o sítio catalítico, o sítio de especificidade e o sítio ativo, enquanto que a subunidade R2 contém dois íons  $\text{Fe}^{3+}$  ligados entre si através de uma ponte  $\mu$ -oxo e um radical livre tirosila [13,14].

A RDR catalisa o ciclo de reações redox envolvido na conversão de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos. No ciclo, os elétrons são transportados da nicotinamida adenina dinucleosídeo fosfato (NADPH) para o ribonucleotídeo através de uma cadeia envolvendo a flavoproteína flavina adenina dinucleosídeo (FAD), a tiorredoxina redutase (TR), a tiorredoxina (T) e a RDR

[15]. Tiorredoxina redutase, tiorredoxina e RDR contêm dissulfetos que participam das reações de transporte de elétrons (Figura 1.5b).

Uma vez que as tiossemicarbazonas são fortes agentes quelantes de ferro, imaginou-se que poderiam exercer sua ação inibitória através da coordenação do metal presente na estrutura da enzima. No entanto, esta suposição parece não se verificar e acredita-se que a forma ativa seja um complexo de ferro, o qual se ligaria a um sítio normalmente ocupado pelo metal e tióis, interrompendo assim a transferência de elétrons [1,2].

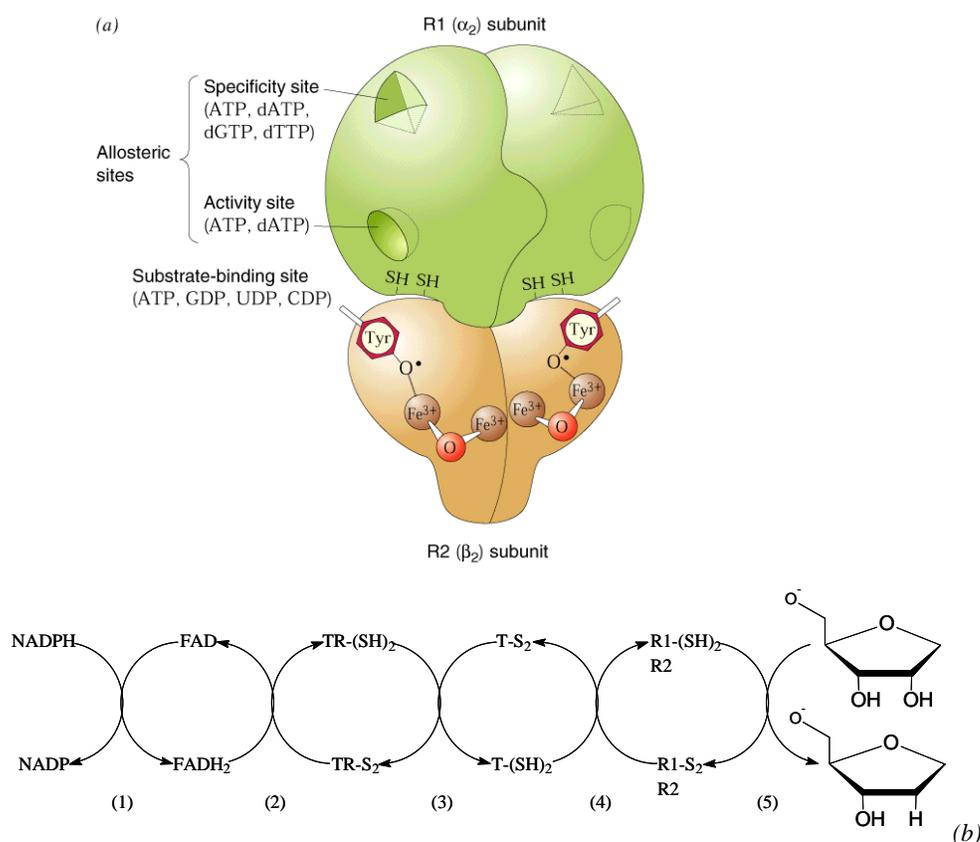


Figura 1.5 - (a) Estrutura da enzima Ribonucleotídeo Difosfato Redutase (RDR); (b) Ciclo de reações redox envolvidas na conversão de ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos, catalisada pela RDR

Beraldo e colaboradores estudaram complexos de ferro(II) e ferro(III) (Figura 1.6) de tiossemicarbazonas  $\alpha(N)$ -heterocíclicas, com o objetivo de investigar mais detalhadamente o mecanismo de ação. Na preparação de complexos de ferro(III) a partir de cloreto férrico, observaram a formação em torno de 20% de ferro(II), sugerindo que o agente redutor deveria ser o próprio ligante, o qual tem a natureza de tiol. Assim a cinética da redução dos complexos

de ferro(III) por excesso do ligante foi investigada [15,16]. A seguir verificaram que complexos de ferro(III) de tiossemicarbazonas podiam ser reduzidos por tióis-modelo de tióis celulares[17]. Propuseram então que o mecanismo de ação envolveria a oxidação do complexo de ferro(II) ao de ferro(III), com a liberação de um elétron que inativaria o radical livre da enzima, seguida da redução do complexo de ferro(III) ao de ferro(II) por um tiol celular.

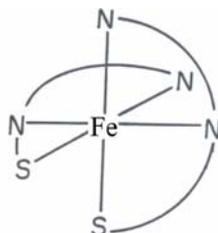


Figura 1.6 - Estrutura do complexo de Fe(III) de 2-formilpiridina tiossemicarbazona

Nosso trabalho compreende o estudo em solução e no estado sólido de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos metálicos e testes de atividade biológica.

Inicialmente investimos no estudo em solução aquosa de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de sua interação com os íons Cu(II) e Fe(III). Desse modo, pudemos determinar as constantes de dissociação dos ligantes e obter as constantes de formação das várias espécies complexadas presentes no equilíbrio. Através da obtenção de curvas de distribuição de espécies em função do pH, verificamos quais espécies predominam em pH fisiológico. Na literatura, há poucos exemplos do estudo de tiossemicarbazonas e de sua interação com cátions metálicos. Beraldo e colaboradores [18] estudaram a interação entre 2-formil e 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e os íons Fe(II) e Fe(III). Garg e colaboradores determinaram as constantes de estabilidade dos complexos formados entre lantanídeos e as tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina [19] e de 1,2-naftoquinona [20].

Em solução aquosa, as tiossemicarbazonas podem existir em duas formas tautoméricas: tiona e tiol. As tiossemicarbazonas neutras (H<sub>2</sub>Am<sub>4</sub>R) encontram-se na forma de tiona, ou seja, protonadas em N(3). Pela desprotonação, as espécies contendo um enxofre de tiolato são formadas (2Am<sub>4</sub>R<sup>-</sup>) [18]. Sob ambas as formas, esses ligantes tridentados podem formar complexos tetraédricos com o Cu(II), na proporção M:L 1:1, e complexos octaédricos com o Fe(III), na

proporção M:L 1:2. O equilíbrio tautomérico das tiossemicarbazonas está mostrado na Figura 1.7.

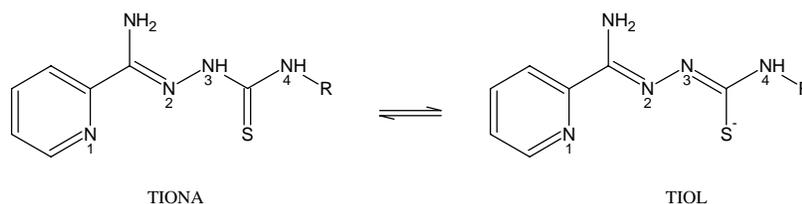


Figura 1.7 - Equilíbrio tautomérico das tiossemicarbazonas

No estado sólido, quatro novos complexos de Fe(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas, solúveis em água, foram isolados. Os complexos foram caracterizados por diversas técnicas, incluindo a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial. Essas técnicas permitem de forma rápida e com soluções de baixas concentrações determinar a estabilidade dos compostos em estudo, nos vários estados de oxidação do metal. Desta forma este estudo permite verificar a reversibilidade (ou irreversibilidade) do processo oxidativo (ou redutivo) e, eventualmente, a formação de intermediários durante este processo redox.

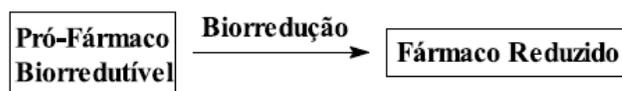
Sabe-se que o estado de oxidação de íons metálicos desempenha fundamental papel em sistemas biológicos. Assim, processos de transferência de elétrons são essenciais no mecanismo de conversão de energia em organismos, o que depende basicamente do estado de oxidação do metal envolvido no processo. Modificações específicas induzidas pelos “bioligantes” são responsáveis pela estabilização dos estados de oxidação dos centros metálicos.

A influência da labilidade de ligantes coordenados, em função do estado de oxidação do metal é conhecida desde os tempos de Werner. Assim, desde aquela remota época é conhecido que complexos de Co(III) podem ser preparados a partir do íon Co(II), o qual é lábil e o complexo pode ser facilmente e rapidamente formado, após o que este íon é oxidado a Co(III), que é inerte. Estes fatos mostram a importância de se estudar os variados estados de oxidação de metais, principalmente quando se tem em mente a aplicação de seus complexos, quer em catálise, bioinorgânica, ou na preparação de fármacos.

Acreditamos ser de suma importância o estudo eletroquímico de nossos complexos de Fe(III), visto que, como mencionado acima, a ação antitumoral das tiossemicarbazonas  $\alpha$ (N)-heterocíclicas dá-se pela inibição da enzima RDR e o

complexo de ferro é a forma ativa da droga. O mecanismo envolve oxidação do complexo de Fe(II) ao de Fe(III).

Além disso, a literatura relata que o mecanismo de ação de muitos agentes antineoplásicos envolve oxi-redução, como é o caso de complexos de Ru(III) e Co(III). No caso do rutênio, a redução *in vivo* para rutênio(II) parece ser necessária para a atividade biológica [21]. Os complexos de rutênio(III), nesse caso, são substâncias inativas (pró-fármacos) que, *in vivo*, sofrem metabolização, geralmente pelo sistema redox celular, dando origem à uma nova substância na forma ativa (fármaco) [21].



Já os complexos de Co(III) de mostardas alifáticas (Figura 1.8) são um exemplo de pró-fármacos biorredutíveis. A redução Co(III)-Co(II) ocorre nas regiões de hipóxia dos tumores sólidos porque o potencial está dentro da faixa ideal para a atividade das enzimas redutases (-400 a -200 mV). O complexo de Co(II) resultante sofre facilmente reações de substituição pela água, liberando a mostarda nitrogenada ativa e  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  (Figura 1.9) [21].

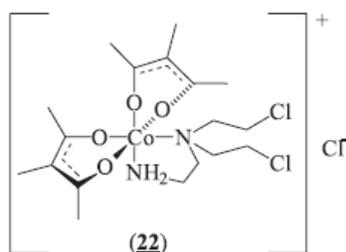


Figura 1.8 - Complexo de Co(III) de mostarda alifática (pró-fármaco) [21]

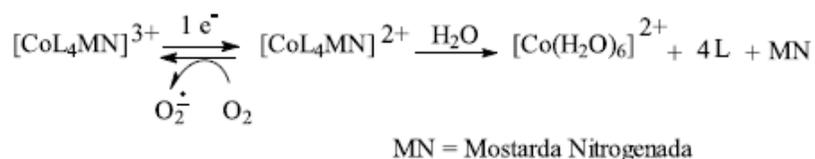


Figura 1.9 - Biorredução de complexos de Co(III) [21]

Desse modo, é importante conhecer os potenciais redox dos complexos obtidos nesse trabalho.

O potencial citotóxico de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) foi estudado, nesse trabalho, utilizando *Artemia salina*.

*Artemia salina* é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salina de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 ‰.

Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas. Quando re-hidratados os ovos de *Artemia salina* eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica.

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório [22].

McLaughlin e colaboradores [23] relatam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Os mesmos autores observaram que os valores de ED<sub>50</sub> encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de LC<sub>50</sub> encontrados nos testes realizados com *Artemia salina*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

Nosso trabalho compreende então sínteses, estudos potenciométricos em solução aquosa, estudos eletroquímicos e testes de atividade utilizando *Artemia salina*. A importância de se estudar uma série de ligantes e complexos, como foi feito aqui, reside na possibilidade de, no futuro, fazer-se estudos de relações estrutura-atividade biológica.