

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Letícia Paiva Fioravanzo

**SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
INIBITÓRIO FRENTE À ENZIMA TIROSINASE POR COMPLEXOS  
DE OXIDOVÂNADIO(IV) E DIOXIDOVANÁDIO(V) DERIVADOS DE  
HIDRAZIDAS AROMÁTICAS.**

Santa Maria, RS  
2021

Letícia Paiva Fioravango

**SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO FRENTE À ENZIMA TIROSINASE POR COMPLEXOS DE OXIDOVÂNADIO(IV) E DIOXIDOVANÁDIO(V) DERIVADOS DE HIDRAZIDAS AROMÁTICAS.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química.**

Orientador: Professor Dr. Davi Fernando Back

Santa Maria, RS  
2021

Fioravanço, Leticia

Síntese, análise estrutural e avaliação do potencial inibitório frente à enzima tirosinase por complexos de oxidovanádio(IV) e dioxidovanádio (V) derivados de hidrazidas aromáticas. / Leticia Fioravanço.- 2021.

88 p.; 30 cm

Orientador: Davi Fernando Back

Coorientadora: Roberta Cargnelutti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. Química Inorgânica 2. Química Bioinorgânica 3. Piridoxal 4. Hidrazidas aromáticas 5. Oxidovanádio(IV) e dioxidovanádio (V) I. Back, Davi Fernando II. Cargnelutti, Roberta III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LETÍCIA FIORAVANÇO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada:

"SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO FRENTE À ENZIMA TIROSINASE POR COMPLEXOS DE OXIDOVÂNADIO(IV) E DIOXIDOVANÁDIO(V) DERIVADOS DE HIDRAZIDAS AROMÁTICAS.",

Elaborada por  
LETÍCIA PAIVA FIORAVANÇO

Como requisito parcial para obtenção do título de  
**Mestre em Química**

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Davi Fernando Back - (Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Patrick Teixeira Campos- IFSul- Pelotas

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Robert Alan Burrow – UFSM

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2021.**

Dedico esse trabalho aos profissionais da saúde e as vítimas da Covid-19, que possamos carregar os aprendizados para experiências futuras e que jamais esqueçamos as memórias que nos marcaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marília e João pelo apoio incondicional nesses dois anos de mestrado, obrigada por me proporcionarem tudo que eu precisava para chegar até aqui. A minha irmã e melhor amiga, Gabriela, por sempre estar perto mesmo estando longe.

A Judit, minha esposa, por todo o carinho e principalmente, paciência nesse tempo conturbados, sou eternamente grata por estar sempre ao meu lado sem você nunca teria chegado até aqui.

Ao professor Davi Back por todos os ensinamentos nesses dois anos, mas principalmente por apoiar a realização desse trabalho.

A banca examinadora por aceitar avaliar esse trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório, principalmente a Jennyfer e Francisco que tornaram as horas de bancada mais divertidas e prazerosas e principalmente a Juliana por se manter firme ao meu lado mesmo quando as circunstâncias pareciam impossíveis.

Ao professor Luis Fernando Royes pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório nesses últimos meses e aperfeiçoar esse trabalho, e aos alunos do laboratório BIOEX por me acolherem com tanto carinho.

A Universidade Federal de Santa Maria pelo espaço e oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa.

Ao pessoal da coordenação pelo excelente trabalho.

Finalmente a todos que fizeram parte desta jornada, meus sinceros agradecimentos.  
Muito Obrigada.

Chemistry will be part of nearly all the challenges  
we will face as a human race – energy, medicines, environment –  
what would these things look like without chemistry?  
(Professor Paul Walton, University of York – Science Horizons report)

## RESUMO

### SÍNTESE, ANÁLISE ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO FRENTE À ENZIMA TIROSINASE POR COMPLEXOS DE OXIDOVÂNADIO(IV) E DIOXIDOVANÁDIO(V) DERIVADOS DE HIDRAZIDAS AROMÁTICAS.

AUTORA: Letícia Paiva Fioravanço  
ORIENTADOR: Davi Fernando Back

Dez ligantes foram sintetizados através da condensação aldólica do aldeído salicílico e do cloridrato de piridoxal (C1AS, C2AS, C3AS, C4AS, C5AS, C1P, C2P, C3P, C4P e C5P) com cinco aminas primárias provenientes de hidrazidas aromáticas *p*-substituídas (OH, CH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, H). Esses ligantes foram complexados com compostos de vanádio (acetoacetato de vanadila(IV) – VO(acac)<sub>2</sub> e pentóxido de vanádio(V) – V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) obtendo-se dez novos complexos, que foram caracterizados pelas seguintes técnicas: espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ultravioleta visível, difração de raio X em monocristal e voltametria cíclica. Além disso, foram realizados testes de voltametria cíclica para observar a presença de processos redox e testes para quantificar o potencial inibitório da enzima tirosinase dos ligantes e complexos. Os resultados da voltametria cíclica mostram uma relação direta dos potenciais redox com a atividade inibitória da enzima tirosinase. Enquanto o complexo C1AS teve o menor pico de corrente de redução e a melhor atividade inibitória, o complexo C1P apresentou maior pico de corrente de re-oxidação e nenhuma atividade inibitória. Seus respectivos ligantes tiveram atividade contrária a eles. Desse modo, pode-se sugerir que o centro metálico do C1AS é responsável pela atividade inibitória do complexo, já no C1P o íon vanádio não favorece essa atividade, uma vez que o ligante sozinho é o que apresenta a melhor atividade.

**Palavras-chave:** Vanádio. Piridoxal. Hidrazidas aromáticas. Tirosinase.

## ABSTRACT

### **SYNTHESIS, STRUCTURAL ANALYSIS AND EVALUATION OF THE INHIBITORY POTENTIAL AGAINST THE TYROSINASE ENZYME BY OXIDOVANADIUM(IV) AND DIOXIDOVANADIUM(V) COMPLEXES DERIVED FROM AROMATIC HYDRAZIDES.**

AUTHOR: Letícia Paiva Fioravanço

ADVISOR: Davi Fernando Back

Ten ligands were synthesized through aldol condensation of salicylic aldehyde and pyridoxal hydrochloride (C1AS, C2AS, C3AS, C4AS, C5AS, C1P, C2P, C3P, C4P and C5P) with five primary amines from p-substituted aromatic hydrazides (OH, CH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, H). These ligands were complexed by vanadium compounds (vanadyl acetoacetate(IV) – VO(acac)<sub>2</sub> and vanadium pentoxide(V) – V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) obtaining ten new complexes, which were characterized by the following techniques: infrared spectroscopy, spectroscopy of visible ultraviolet, X-ray diffraction in single crystal and cyclic voltammetry. In addition, cyclic voltammetry experiments were carried out to observe the presence of redox processes and tests to quantify the inhibitory potential of the tyrosinase enzyme of ligands and complexes. Cyclic voltammetry results show a direct relationship between redox potentials and the inhibitory activity of the tyrosinase enzyme. While the C1AS complex had the lowest peak reduction current and the best inhibitory activity, the C1P complex had the highest peak reoxidation current and no inhibitory activity. Their respective ligands had activity contrary to them. Thus, it can be suggested that the metallic center of C1AS is responsible for the inhibitory activity of the complex, whereas in C1P the vanadium ion does not favor this activity, since the ligand alone is the one with the best activity.

**Keywords:** Vanadium. Pyridoxal. Aromatic hydrazides. Tyrosinase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de reação de condensação entre aldeído ou cetona e amina primária, levando à formação da função imina (base de Schiff) e água. ....	19
Figura 2 - Complexo de Co (II) com ligante base de Schiff 2,6-bis(2,6-diethylphenyliminomethyl)pyridine. ....	19
Figura 3 - Estrutura molecular do (2,6-dimetil-N-(2-hidroxifenilmetilideno)imidazol[2,1-b][1,3,4]tiodiazol-5-carbohidrazida. ....	20
Figura 4 - Estruturas moleculares naturalmente derivatizadas da vitamina B6. ....	21
Figura 5 - Esquema simplificado do mecanismo de racemização de aminoácidos. ....	22
Figura 6 -Complexo 1 (direita) [FeLCl]Cl.H <sub>2</sub> O com a projeção ORTEP 50% de probabilidade e complexo 2 (esquerda) (CoLN <sub>3</sub> ) com a projeção ORTEP 50% de probabilidade. ....	23
Figura 7 - A estrutura molecular do complexo de Zn mostrando o esquema de numeração dos átomos. ....	23
Figura 8 - Representação da estrutura molecular do complexo [VO <sub>2</sub> (L <sub>2</sub> H)]. ....	24
Figura 9 - Captação e distribuição de compostos de vanádio no corpo. ....	25
Figura 10- Representação de quatro complexos de vanádio sintetizados por Szklarzewicz e colaboradores. ....	26
Figura 11 - Complexo de VIV com diferentes atividades anticancerígenas. ....	26
Figura 12 - Estrutura molecular dos compostos que apresentaram atividade anti-HIV. ....	27
Figura 13 - Simplificação de uma reação enzimática, onde E, S e P representam, substrato, enzima e produto respectivamente; ES representa complexo transitório da enzima com o substrato. ....	28
Figura 14 - Exemplo da transformação duplo-recíproca do gráfico de Michaelis-Menten ...	29
Figura 15 - O gráfico duplo-recíproco possibilita uma maneira fácil de determinar se o inibidor de uma enzima é competitivo, incompetitivo ou misto. a) Inibição competitiva; b) Inibição incompetitiva; c) Inibição mista. ....	29
Figura 16 - (A) Mecanismo para atividade de monofenolase e difenolase da tirosinase. (B) Mecanismo da enzima dopachormone tautomerase e a transformação do dopacromo em DHICA (ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico) um intermediário na biossíntese da melanina. ....	33
Figura 17 - Esquema simplificado dos dois ligantes utilizados nesse trabalho. ....	37
Figura 18 - Esquema simplificado dos tipos de complexos esperados. ....	38
Figura 19 - Espectro de absorção eletrônica do ligante L5P. ....	44
Figura 20 - Espectro de absorção eletrônica do complexo C5P. ....	45
Figura 21 - Voltametria cíclica dos complexos de vanádio (a) C1P-C5P e (b) C1AS-C5AS, em solução de DMF, utilizando solução 0,1 M de TBAPF <sub>6</sub> como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV/s. ....	46
Figura 22 - Complexo C5AS com trietilamônio como contra íon. ....	49
Figura 23 - Complexo C1AS onde dispensa a necessidade de um contra íon, uma vez que houve a protonação do grupo hidrazina. ....	49
Figura 24 - Projeção da estrutura molecular do complexo C1P. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. ....	50
Figura 25 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C1P (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita). ....	51
Figura 26 - Projeção da estrutura molecular do complexo C5AS. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. ....	51

Figura 27 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C5AS (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita). .....	52
Figura 28 - Projeção da estrutura molecular do complexo C4AS. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50% .....	52
Figura 29 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C4AS (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita). .....	53
Figura 30 - Projeção da estrutura molecular do complexo C2AS (acima) e C4P (abaixo). Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. .....	54
Figura 31 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C2AS (acima), C4P (abaixo esquerda), pictograma de operadores de simetria (abaixo direita). .....	55
Figura 32 - Projeção da estrutura molecular dos complexos C1AS, C5P e C2P respectivamente. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. .....	56
Figura 33 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C2P (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita). .....	57
Figura 34 - Projeção da estrutura molecular do complexo C3AS. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50% .....	57
Figura 35 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C3AS (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita). .....	58
Figura 36 - Projeção da estrutura molecular do complexo C3P. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%. .....	59
Figura 37 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C3P (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita). .....	59
Figura 38 - Cinética do ácido Kojico e a linearização do gráfico mostrando um perfil de inibição competitiva. ....	61
Figura 39 - Cinética do complexo C1AS e a linearização do gráfico mostrando um perfil de inibição competitiva. ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes anti-tirosinase já reportados na literatura .....	32
Tabela 2 - Códigos dos ligantes e rendimentos de acordo com seus substituintes.....	36
Tabela 3 - Apresentação dos diferentes solventes e bases utilizado na síntese de cada complexo .....	38
Tabela 4 - Número de onda das principais bandas dos estiramentos características dos ligantes.....	43
Tabela 5 - Número de onda das principais bandas dos estiramentos características dos complexos.....	43
Tabela 6 - Valores de comprimento de onda relativos à absorvância máxima das bandas dos complexos.....	45
Tabela 7 - Potenciais redox dos complexos de vanádio em solução de DMF (E versus SHE). .....	47
Tabela 8 - Parâmetros cristalográficos gerais para os complexos sintetizados. ....	48
Tabela 9 - Porcentagem de inibição dos complexos e ligantes sintetizados e do ácido kojico utilizado como padrão de comparação. ....	60

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1.	BASES DE SCHIFF .....	18
3.2.	HIDRAZIDAS .....	20
3.3.	PIRIDOXAL .....	20
3.4.	VANÁDIO .....	24
3.5.	ENZIMAS.....	28
3.6.	TIROSINASE .....	30
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1.	ASPECTOS GERAIS .....	35
4.2.	PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE.....	35
<b>4.2.1.</b>	<b>MATERIAIS E SÍNTESE DOS LIGANTES (L1AS-L5AS E L1P-L5P).....</b>	<b>35</b>
4.2.1.1.	Procedimento experimental para a síntese dos ligantes. ....	35
<b>4.2.2.</b>	<b>MATERIAIS E SÍNTESE DOS COMPLEXOS (C1AS-C5AS E C1P – C5P)...</b>	<b>36</b>
4.3.	DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM MONOCRISTAL .....	39
4.4.	PONTO DE FUSÃO.....	40
4.5.	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NA REGIÃO UV/VIS .....	40
4.6.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) .....	40
4.7.	VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	40
4.8.	ENSAIO ENZIMÁTICO .....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1.	PARTE 1: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS .....	42
<b>5.1.1.</b>	<b>RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.2.</b>	<b>RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NA REGIÃO UV/VIS .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.3.</b>	<b>VOLTAMETRIA CÍCLICA .....</b>	<b>45</b>
5.2.	PARTE 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO CRISTALOGRÁFICA.....	47
<b>5.2.1.</b>	<b>RESULTADOS CRISTALOGRÁFICOS GERAIS .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.2.</b>	<b>SISTEMA CRISTALINO TRICLÍNICO.....</b>	<b>50</b>
5.2.2.1.	Grupo espacial P1 .....	50

<b>5.2.3. SISTEMA CRISTALINO MONOCLÍNICO .....</b>	<b>51</b>
5.2.3.1. Grupo espacial $P12_11$ .....	51
5.2.3.2. Grupo espacial $C1c1$ .....	52
5.2.3.3. Grupo espacial $P2_1/n$ .....	53
5.2.3.4. Grupo espacial $P2_1/c$ .....	55
<b>5.2.4. SISTEMA CRISTALINO ORTORRÔMBICO .....</b>	<b>57</b>
5.2.4.1. Grupo espacial $Pbca$ .....	57
5.2.4.2. Grupo espacial $P2_12_12_1$ .....	58
5.3. PARTE 3: POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA TIROSINASE .....	60
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS COMPLEXOS. ....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 2 - PARÂMETROS CRISTALOGRAFICOS DOS COMPLEXOS SINTETIZADOS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO 3 – ESPECTROS DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NA REGIÃO UV/VIS EM SOLUÇÃO DOS COMPLEXOS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO 4 - ESPECTROS DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS COMPLEXOS.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O vanádio, nos últimos anos, vem sendo amplamente estudado devido as importantes funções que desempenha em diferentes sistemas biológicos. Muitos organismos vivos acumulam vanádio ou utilizam-no nos processos biológicos como o ser humano, que obtém cerca de 0,01-0,03 mg V/dia através da alimentação e água potável (WILLSKY et al., 2011). As espécies de vanádio são eficazes em diversos processos enzimáticos podendo inibir diversas enzimas (lipoproteína lipase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tirosina fosforilase, glicose-6-fosfato desidrogenase, adenilato ciclase, citocromo oxidase e glicogênio sintase) e estimulando a função de outras ( $H^+ / K^+ -ATPase$ , fosfofrutocinase, miosina ATPase, dineína,  $Na^+ - K^+ -ATPase$ , adenilato quinase e colina esterase) (KIOSEOGLOU et al., 2015). Devido essa capacidade de interação com uma gama de enzimas, os compostos de vanádio vem sendo foco de várias pesquisas com fins terapêuticos (REHDER, 2013).

Costa Pessoa, Etcheverryb e Gambino publicaram um artigo de revisão de extrema relevância mostrando a importância da síntese de novos compostos de vanádio e o potencial destes compostos como agentes terapêuticos em um amplo espectro de atividades (PESSOA et al., 2015).

Dentre as enzimas de relevância medicinal, a tirosinase (EC 1.14.18.1), também conhecida como polifenol oxidase (PPO), monofenol ou o-difenol O<sub>2</sub> oxidoreductase, é uma metaloenzima responsável pela produção de melanina, um termo usado para descrever um grupo de pigmentos naturais encontrados em microrganismos, plantas e animais (CHEN et al., 2003). Mudanças em sua atividade podem ocasionar distúrbios de pigmentação (RIVAS e PANDYA, 2013) uma hiperpigmentação, causada pelo aumento da atividade da tirosinase, é uma característica aparente de um possível melanoma (DESAI, 2014).

A tirosinase possui atividade tanto como monooxigenase como oxidase - a hidroxilação de monofenóis em o-difenóis e a oxidação de o-difenóis em o-quinonas correspondentes, respectivamente (SONG et al., 2006). Ambas as atividades são resultantes da ligação de dioxigênio a dois átomos de cobre que estão localizados no sítio ativo da enzima e geralmente definido como Cu-A e Cu-B. A tirosinase inicia a cascata da melanogênese oxidando a L-tirosina em dopaquinona (DQ). Essa reação é também a etapa limitante do processo, uma vez que o restante das reações sequenciais pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico. A DQ é convertida em 3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) e dopacromo por auto-oxidação. Essa

reação pode ser revertida pela tirosinase, que converte L-DOPA em DQ novamente (CHANG, 2009).

Compostos contendo o íon vanádio mostraram-se candidatos potentes para tratamentos de possíveis desordens de pigmentação, dessa forma, inibidores da tirosinase podem ser de grande interesse para a indústria de cosméticos, além de apresentarem potencial para redução de um dos mais letais tipos de câncer para indústria farmacêutica.

Nessa perspectiva, no presente trabalho buscou-se analisar bioquimicamente o potencial inibitório de dez novos complexos de vanádio e seus respectivos ligantes frente a enzima tirosinase.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar ligantes do tipo base de *Schiff* utilizando aldeídos e aminas de hidrazidas aromáticas *p*-substituídas e complexar tais ligantes com acetilacetato de vanádila(IV) (VO(acac)<sub>2</sub>) e pentóxido de vanádio(V) (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Posteriormente, avaliar o potencial inibitório desses complexos frente à enzima tirosinase.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar ligantes a partir do aldeído salicílico e do cloridrato de piridoxal com uma série de aminas provenientes de hidrazidas aromáticas *p*-substituídas;

2. Complexar os ligantes com dois diferentes sais de vanádio: acetilacetato de vanádila(IV) (VO(acac)<sub>2</sub>) e pentóxido de vanádio(V) (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

3. Caracterizar os complexos obtidos através das seguintes técnicas: difração de raio X em monocristal; espectrofotometria de infravermelho; espectrofotometria do ultravioleta e luz visível; ponto de fusão e voltametria cíclica;

4. Avaliar o potencial inibitório da enzima tirosinase dos ligantes e complexos obtidos bem como determinar a cinética e o tipo de inibição do complexo C1AS.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo serão abordados os principais tópicos relevantes para esse trabalho, começando com as bases de *Schiff*, primeira parte do ligante utilizado nessa dissertação. Após serão descritas as hidrazidas segunda parte dos ligantes orgânicos, em seguida mostrarei as principais características do vitâmero piridoxal terceira parte fundamental dos ligantes sintetizados. No item 3.4. será descrito a importância biológica do metal Vanádio e complexos relacionados na literatura. E por último, será explicado a importância das enzimas nos sistemas biológicos e apresentado a enzima tirosinase alvo das atividades biológicas desse trabalho.

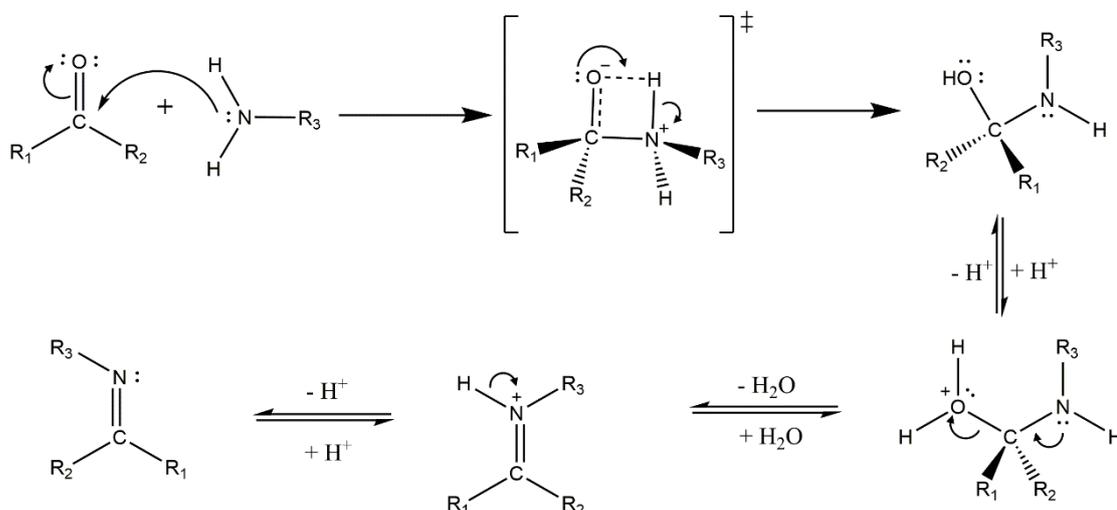
#### 3.1. BASES DE SCHIFF

Nesse trabalho foram sintetizados bases de *Schiff* que apresentam um grupo funcional formado por uma ligação dupla carbono-nitrogênio (C=N) (COZZI, 2004), onde podem ser obtidos através da reação de condensação entre uma amina primária (R-NH<sub>2</sub>) e uma cetona ou aldeído. Seu nome é em homenagem ao químico alemão *Hugo Schiff* (1834- 1915), primeiro a sintetizar e publicar tais compostos em 1864 (ABU-DIEF e MOHAMED, 2015).

A rota reacional de formação da base de *Schiff* inicia com a adição nucleófila da amina sobre a carbonila eletrofílica do aldeído, formando um hemiaminal como intermediário (BHAT et al., 1996) (Figura 1). Na formação da base de *Schiff* é gerada água como subproduto e sua purificação pode ser feita através da recristalização com diferentes solventes como: etanol, metanol ou acetona.

Quando há mais de uma base de *Schiff* atuando como ligantes orgânicos levam, na maioria dos casos, a formação de complexos polidentados (M-O e M-N) com variado número de coordenação e geometria (ROBIN e FROMM, 2006). Tais complexos podem apresentar atividade catalítica e estereosseletividade em relação com substratos orgânicos.

Figura 1 - Mecanismo de reação de condensação entre aldeído ou cetona e amina primária, levando à formação da função ímina (base de Schiff) e água.



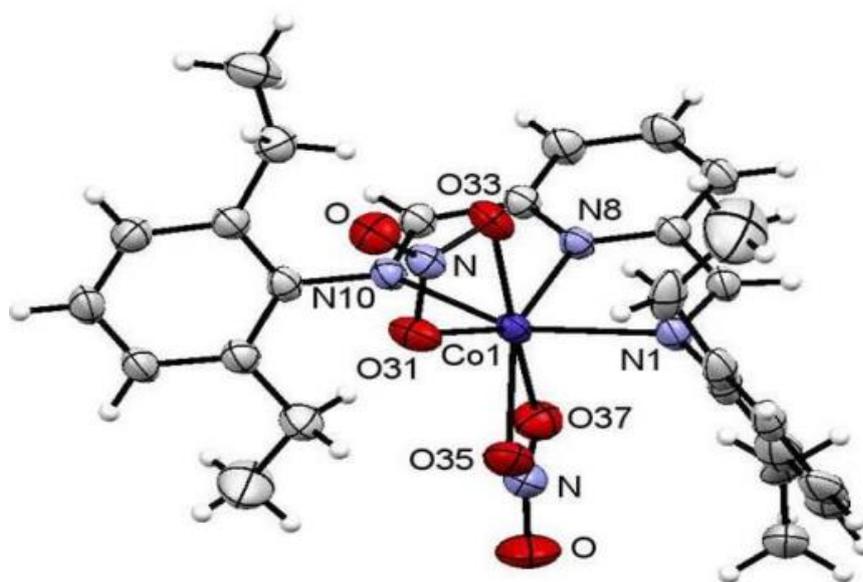
**R<sub>1</sub> e R<sub>3</sub> = Grupo alquila ou acila**

**R<sub>2</sub> = Grupo alquila, acila ou H**

Fonte: (BHAT et al., 1996)

Em 2015, Martinez-Bulit e colaboradores (MARTINEZ-BULIT et al., 2015), sintetizaram complexos de cobalto(II) onde seu ligante era uma base de Schiff bis-azometina tridentada tipo N,N,N derivada de 2,6-piridinadicarbaldeído e 2,6-dietilanilina Figura 2.

Figura 2 - Complexo de Co (II) com ligante base de Schiff 2,6-bis(2,6-diethylphenyliminomethyl)pyridine.



Fonte: (MARTINEZ-BULIT et al., 2015)

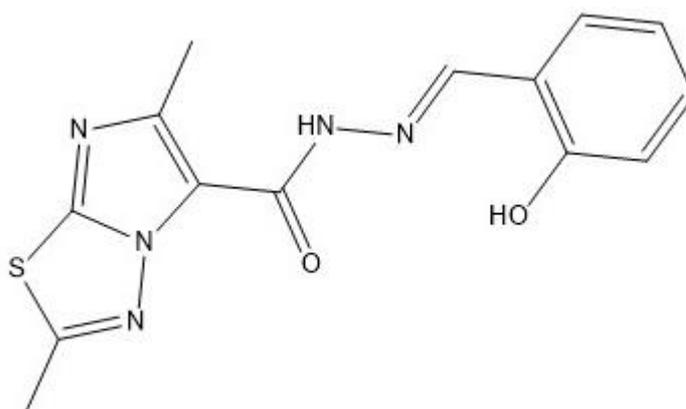
### 3.2. HIDRAZIDAS

As hidrazidas são uma classe de compostos orgânicos caracterizados por uma ligação covalente nitrogênio-nitrogênio com dois substituintes em cada átomo de nitrogênio onde ao menos um deles é um grupo acilo criando possibilidade para aplicações na química de coordenação.

As hidrazidas apresentam amplas propriedades biológicas tais como atividade antibacteriana (ROLLAS e KUCUKGUZEL, 2007), agentes antituberculosos (SAH e PEOPLES, 1954), anti-inflamatória (TODESCHINI et al., 1998) e atividade antiviral (ABDEL-AAL et al., 2006). Além das propriedades citadas, as hidrazidas apresentam atividades antitumorais, sendo seguras no que diz respeito a sua toxicidade, frente a linhagens celulares variadas (COCCO et al., 2006), (IMRAMOVSKÝ et al., 2007).

Na Figura 3 o composto (2,6-dimetil-N-(2-hidroxifenilmetilideno)imidazol[2,1-b][1,3,4]tiodiazol-5-carbohidrazida é ativo contra células de câncer de ovário e renal (GÜRSOY, A. e KARALI, 2003; GÜRSOY, E. e GÜZELDEMIRCI, 2007).

Figura 3 - Estrutura molecular do (2,6-dimetil-N-(2-hidroxifenilmetilideno)imidazol[2,1-b][1,3,4]tiodiazol-5-carbohidrazida.



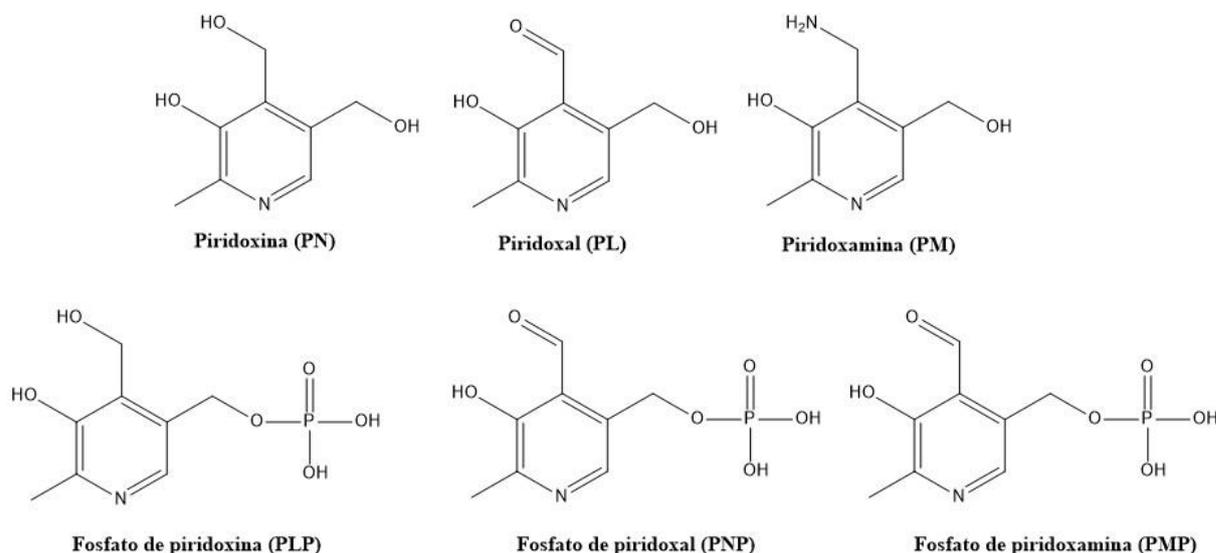
Fonte: (GÜRSOY, A. e KARALI, 2003)

### 3.3. PIRIDOXAL

A vitamina B6 é um micronutriente essencial, hidrossolúvel, que compõe o grupo de vitaminas do complexo B. É composta pelos vitâmeros piridoxina, piridoxal, fosfato de piridoxal, piridoxamina, fosfato de piridoxima e fosfato de piridoxamina que no sistema

biológico são interconvertidas (ACQUAYE e RICHARDSON, 1992) (ANICETO e FATIBELLO-FILHO, 2002) (Figura 4).

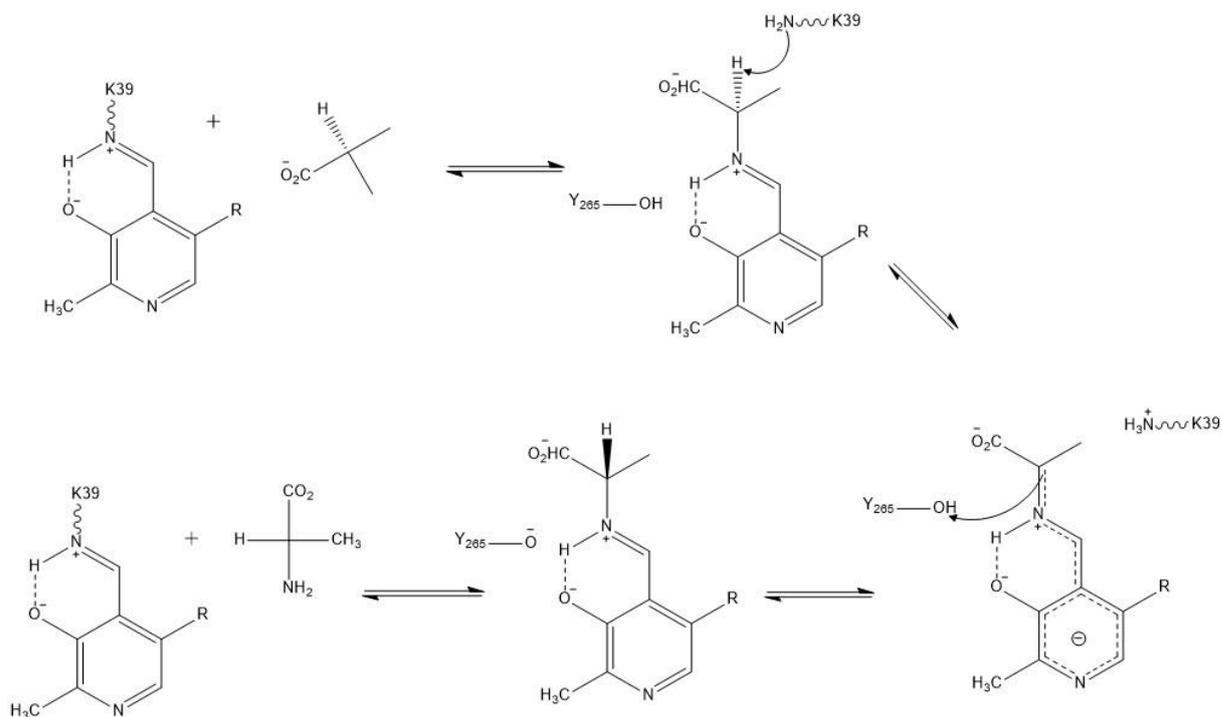
Figura 4 - Estruturas moleculares naturalmente derivatizadas da vitamina B6.



A piridoxina, composto predominante na vitamina B6, após a conversão em piridoxal-5'-fosfato, é incorporada em uma variedade de enzimas que catalisam os processos de biossíntese de aminoácidos, transaminação, descarboxilação bem como processos de racemização (SHARIF et al., 2007). Este fosfato (a forma de piridoxal contendo uma função fosfato) atua como catalisador em uma variedade de reações nos carbonos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  dos aminoácidos (NELSON E COX, 2013). Nas reações de racemização, por exemplo, ocorre a interconversão entre as formas L- e D- destes compostos, como mostrado na Figura 5 (NELSON E COX, 2013).

Metzler em 1954 comprovou que o piridoxal fosfato estava presente em enzimas que catalisavam reações contendo diferentes aminoácidos e demonstrou a sua importância na síntese de neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina e serotonina (METZLER et al., 1954).

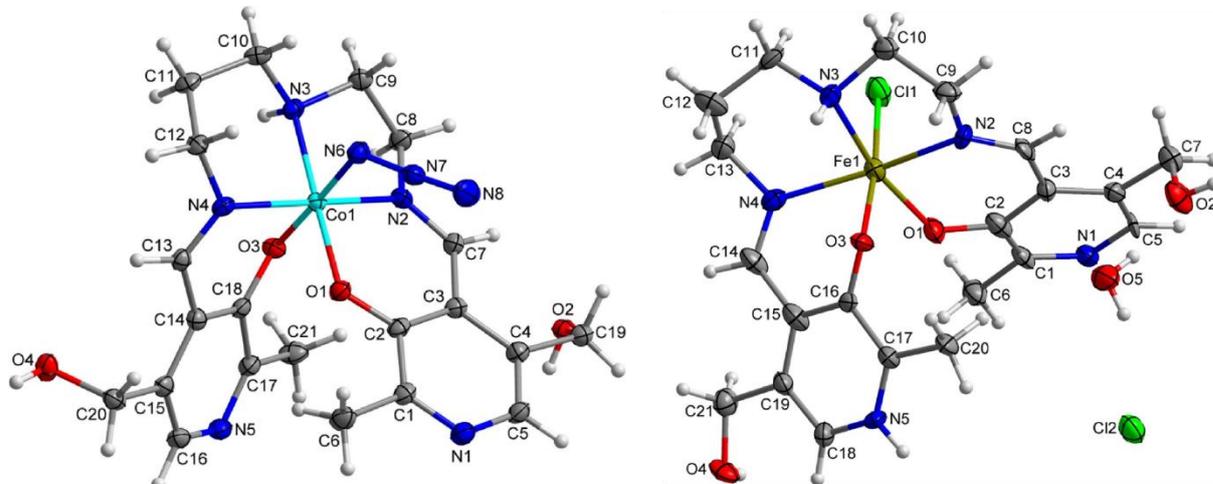
Figura 5 - Esquema simplificado do mecanismo de racemização de aminoácidos.



Fonte: (NELSON E COX, 2013).

Em 2021 Murašková (MURAŠKOVÁ et al., 2021) e colaboradores apresentaram complexos de Ferro (III) e cobalto (III) com ligantes do tipo Bases de *Schiff* derivadas do piridoxal. O complexo 1 foi preparado por *template* sem isolar a base de Schiff, usando uma solução do ligante e adicionado uma solução do sal metálico correspondente. O complexo 2 foi preparado a partir de um complexo de ferro, previamente preparado, isolado, purificado e caracterizado dissolvido em metanol (Figura 6).

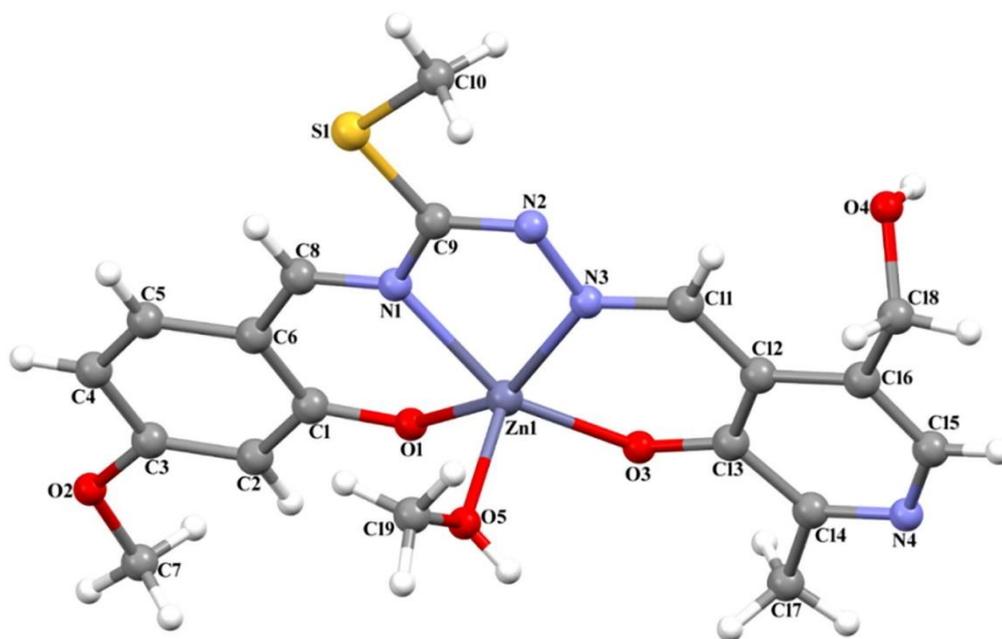
Figura 6 -Complexo 1 (direita)  $[\text{FeLCl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  com a projeção ORTEP 50% de probabilidade e complexo 2 (esquerda)  $(\text{CoLN}_3)$  com a projeção ORTEP 50% de probabilidade.



Fonte: (MURAŠKOVÁ et al., 2021)

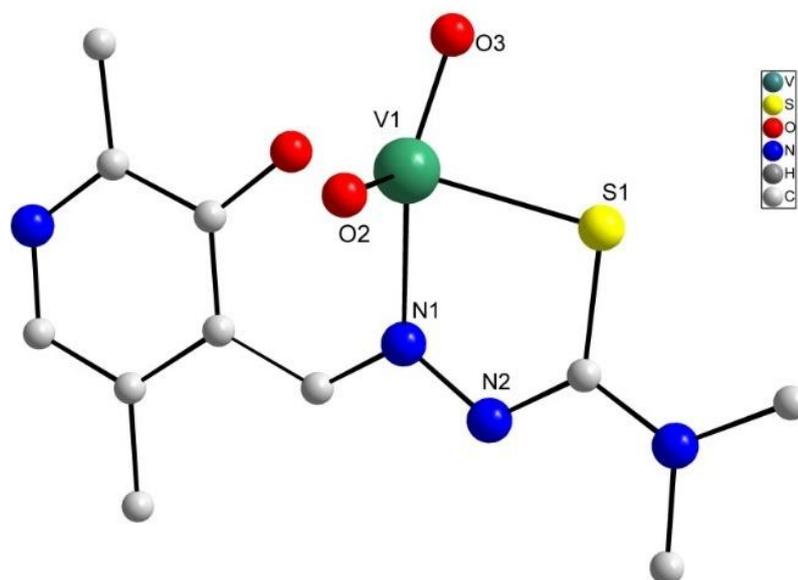
Já Poladian e colaboradores (POLADIAN et al., 2021) sintetizaram um novo complexo de zinco coordenado ao ligante derivado do piridoxal e S-metil-tiosemicarbazona (Figura 7). E em 2018 Jakusch e colaboradores (JAKUSCH et al., 2018) obtiveram complexos de vanádio, partindo de ligantes derivados do piridoxal e de tiosemicarbazonas (Figura 8).

Figura 7 - A estrutura molecular do complexo de Zn mostrando o esquema de numeração dos átomos.



Fonte: (POLADIAN et al., 2021).

Figura 8 - Representação da estrutura molecular do complexo [VO<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>H)].



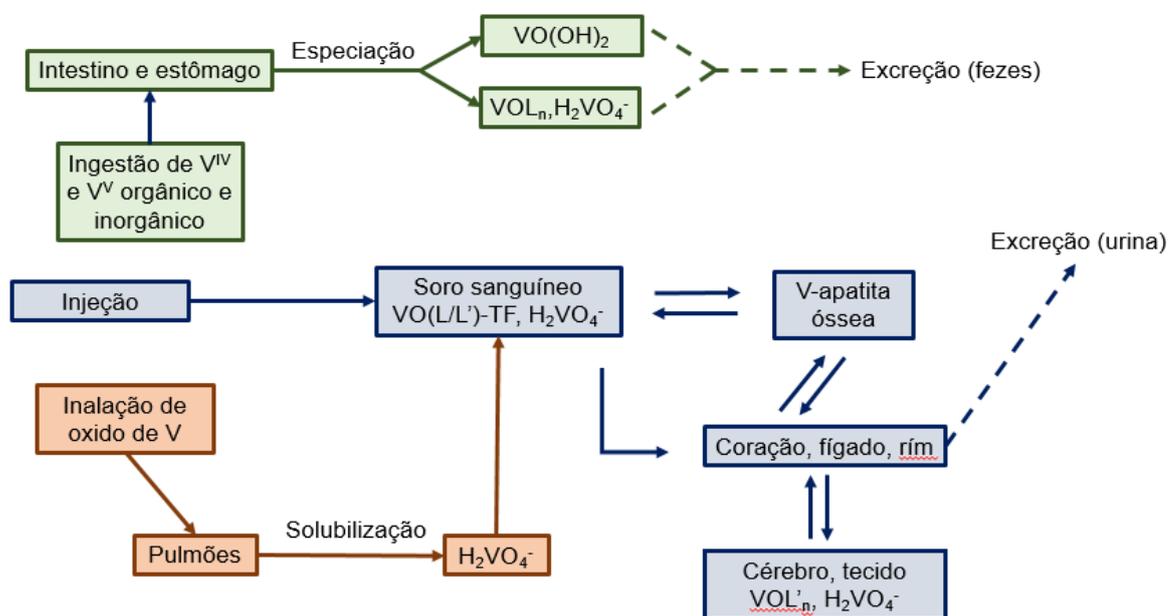
Fonte: (JAKUSCH et al., 2018)

### 3.4. VANÁDIO

O vanádio é o 18º elemento mais abundante da crosta terrestre (0,019%) e está amplamente distribuído no solo, em fósseis, na água, no ar e nos seres vivos (REHDER, 2012). Nos últimos 15 anos ele, vem sendo foco de várias pesquisas medicinais para um potencial uso de compostos de vanádio (CV) para fins terapêuticos (REHDER, 2013), (WILLSKY et al., 2011). Muitos organismos vivos acumulam ou utilizam o vanádio em seus processos biológicos. O ser humano obtém cerca de 0,01-0,03 mg V/dia pela alimentação e água potável (Figura 9).

Recentemente muitos estudos relataram que compostos de vanádio possuem efeitos miméticos aos da insulina, atividade que pode ser causada pela estimulação da autofosforilação do receptor da insulina. O grupo de Szklarzewicz (SZKLARZEWICZ et al., 2021) preparou 16 novos CVs e avaliaram sua capacidade em transportar glicose e sua citotoxicidade. Em todos os CVs estudados, em geral, V<sup>IV</sup> foi encontrado um pouco mais ativo e menos tóxico do que os complexos V<sup>V</sup>. Os CVs podem ser um dos mais promissores complexos para o tratamento da diabetes (Figura 10).

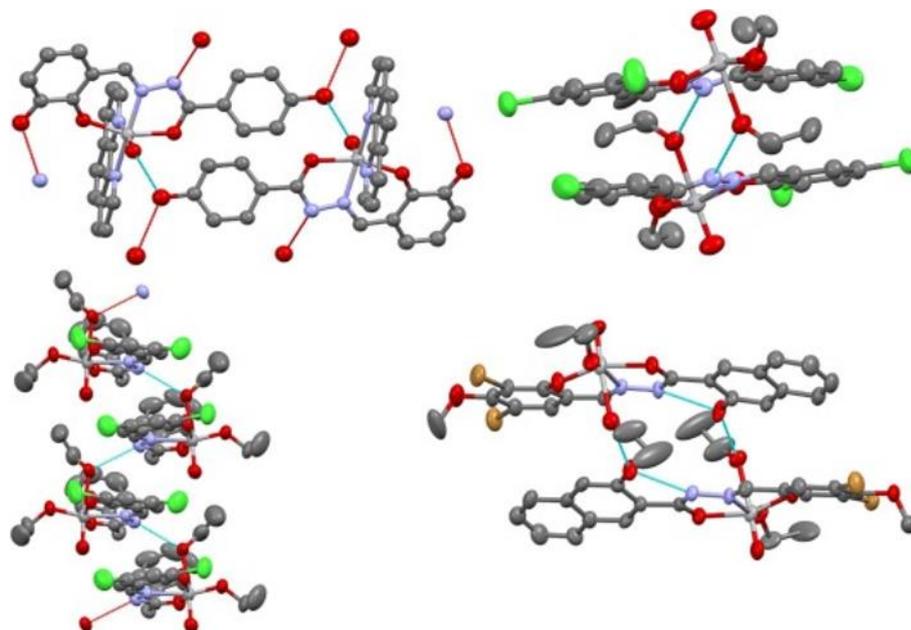
Figura 9 - Captação e distribuição de compostos de vanádio no corpo.



Nos últimos anos, também tem se notado que os CV apresentam propriedades anticancerígenas, devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam alterações em organelas celulares, como os lisossomos, as mitocôndrias e as proteínas globulares. Como consequência, interrompem o metabolismo celular e podem levar a apoptose. Além disso, a proliferação celular também pode ser perturbada por efeitos genotóxicos do vanádio exercido no núcleo das células e causando danos ao DNA (PESSOA et al., 2015).

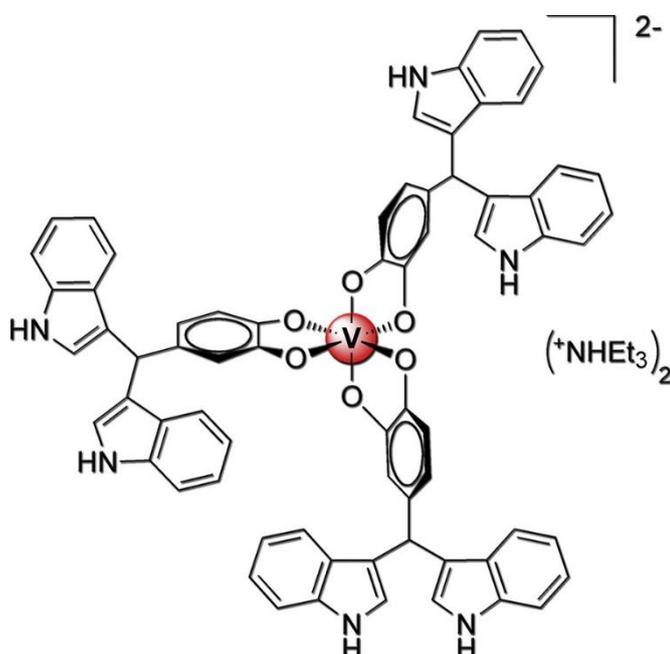
Dankhoff (DANKHOFF et al., 2019) sintetizou um CV com distintas atividades anticancerígenas derivado do 3,3'-Diindolilmetano, produto natural da indol-3-carbinol encontrado em várias plantas de Brassica. Esse novo complexo de  $V^{IV}$  (Figura 11) inibiu o crescimento de diferentes células tumorais, levou ao aumento de espécies reativas de oxigênio, diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, além disso, apresentou atividade de interação com o DNA semelhante a cisplatina.

Figura 10- Representação de quatro complexos de vanádio sintetizados por Szklarzewicz e colaboradores.



Fonte: (SZKLARZEWICZ et al., 2021)

Figura 11 - Complexo de V<sup>IV</sup> com diferentes atividades anticancerígenas.

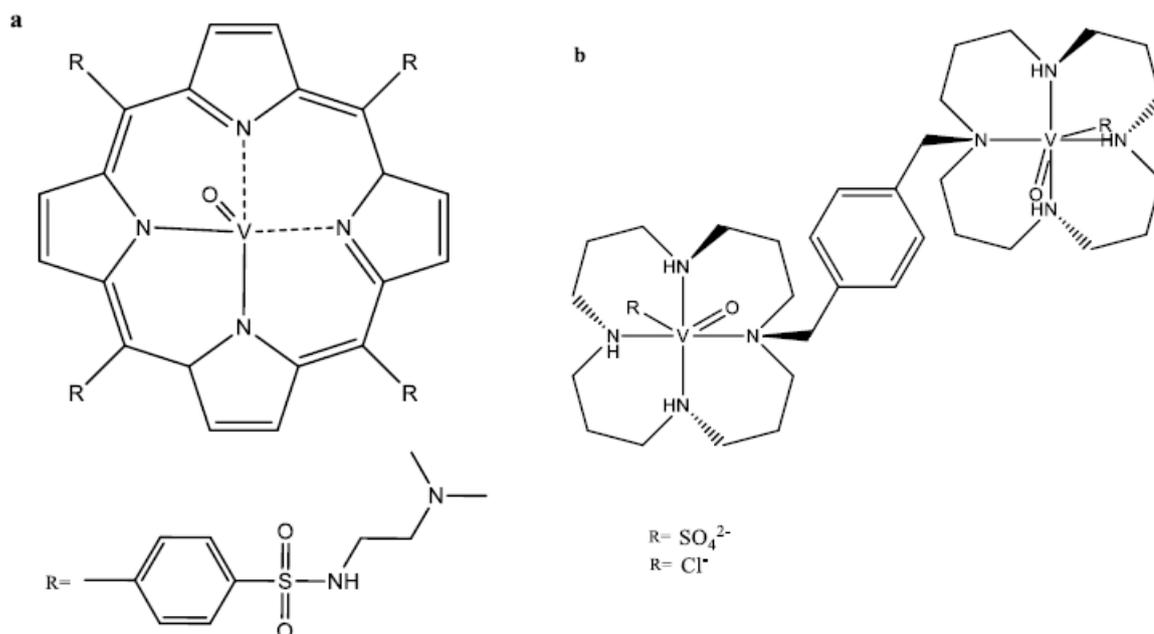


Fonte: (DANKHOFF et al., 2019)

Compostos de vanádio também apresentaram atividade sobre certos vírus, bactérias e fungos. Complexos de polioxotungstatos substituídos por vanádio exibem potentes propriedades antivirais contra HIV, influenza, dengue e SARS (síndrome respiratória aguda grave) (SHIGETA et al., 2003). O complexo V<sup>IV</sup> O-porfirínico (Figura 12), contendo grupos

funcionais aminsulfonilo, exibiu uma inibição de 97% do retrovírus causador da HIV (WONG et al., 2005).

Figura 12 - Estrutura molecular dos compostos que apresentaram atividade anti-HIV.



Fonte: (WONG et al., 2005)

Gambino, em 2011, publicou uma revisão abrangente sobre o estado atual da potencialidade dos compostos de vanádio no tratamento de doenças negligenciadas. O trabalho analisou a pesquisa realizada até o final de 2010 sobre CVs como agentes prospectivos contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp e *Entamoeba histolytica*, os parasitas protozoários que são agentes causadores da tripanossomíase americana (doença de Chagas), leishmaniose e amebíase, respectivamente (GAMBINO, 2011).

Complexos metálicos contendo em sua estrutura bases de *Schiff* derivados da condensação de 1H-indole-3-carboxaldeído e 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-3-pirazolin-5-ona (HL) foram testados quanto à atividade antimicrobiana in vitro contra bactérias gram-positivas (*Salmonella staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria monocytogenes*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. typhimurium*) bem como atividade antifúngica contra fungos do tipo *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*. Os metais de coordenação, em particular o  $\text{V}^{\text{IV}}$  em  $[\text{VO}(\text{HL})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{SO}_4$ , levaram a um aumento da atividade antibacteriana e antifúngica (ROSU et al., 2012).

### 3.5. ENZIMAS

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores nos organismos vivos, reduzindo a energia de ativação para que as reações químicas ocorram (JAEGER e EGGERT, 2004). As reações enzimáticas ocorrem quando o substrato se liga ao sítio ativo da enzima, dando-se a conversão do substrato (S) em um novo produto (P), esquematicamente demonstrado pelo esquema de Briggs-Haldane (PEARLSTEIN et al., 2017) (Figura 13). Como catalisadores as enzimas não são habitualmente destruídas e não alteram o equilíbrio químico da reação que catalisam.

Figura 13 - Simplificação de uma reação enzimática, onde E, S e P representam, substrato, enzima e produto respectivamente; ES representa complexo transitório da enzima com o substrato.



Fonte: (JAEGER e EGGERT, 2004)

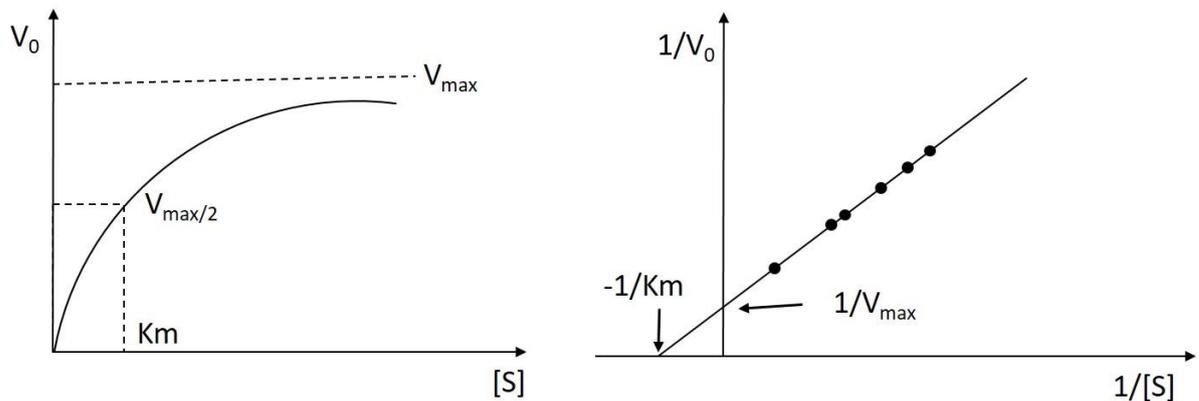
A relação entre a concentração do substrato (S) e a velocidade máxima (V<sub>max</sub>) é estabelecida por meio de K<sub>m</sub> (constante de Michaelis-Menten), que pode ser determinada pela relação entre as velocidades de reação (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> e K<sub>3</sub>). A equação de Michaelis-Menten define a relação quantitativa entre a velocidade inicial (V<sub>0</sub>), a velocidade máxima (V<sub>max</sub>) e a concentração do substrato, ou seja, K<sub>m</sub> equivale à concentração do substrato na qual V<sub>0</sub> é a metade da V<sub>max</sub>. V<sub>0</sub> é determinada pela quebra do complexo ES de acordo com a equação V<sub>0</sub>=k<sub>2</sub>[ES]. Através de uma série de expressões algébricas que irá definir o a constante de Michaelis como sendo: (K<sub>3</sub>+K<sub>2</sub>)/K<sub>1</sub>. Assim a equação final de Michaelis-Menten é : **V<sub>0</sub>**= V<sub>max</sub> [S] / (K<sub>m</sub>+ [s]) (CORNISH-BOWDEN, 2015).

A constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) normalmente é usada como um indicador de afinidade da enzima pelo substrato, o que mostra que cada enzima-substrato possui um único K<sub>m</sub>, desse modo, substratos diferentes que agem com uma dada enzima apresentam valores de K<sub>m</sub> diferentes.

A equação de Michaelis-Menten pode sofrer transformações e assim evidenciar uma análise específica. Um exemplo é a transformada duplo-recíproca denominada de equação de

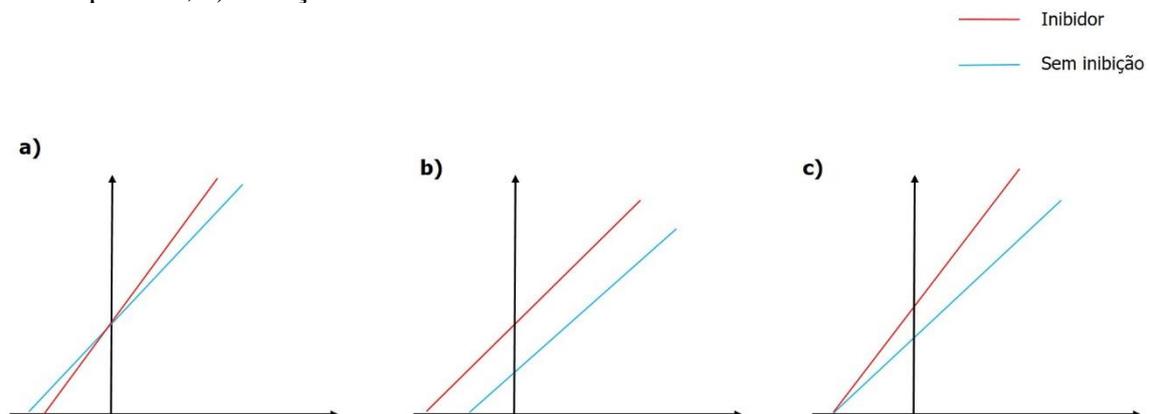
Lineweaver-Burk:  $1/V_0 = 1/V_{max}*[S] + 1/V_{max}$  (Figura 14). Esta equação permite uma determinação cuidadosa dos dados experimentais de  $V_{max}$  (eixo das abcissas),  $K_m$  (eixo das ordenadas) e dos mecanismos de inibição de enzimas (GRANT, 2018).

Figura 14 - Exemplo da transformação duplo-recíproca do gráfico de Michaelis-Menten .



Existem duas classes de inibidores enzimáticos: irreversíveis e reversíveis. Os inibidores irreversíveis ligam-se covalentemente a enzima, ou formam uma ligação não covalente estável, ou ainda destroem um grupo funcional essencial para a atividade da mesma. Os inibidores enzimáticos reversíveis podem diminuir a atividade da enzima de forma competitiva, não competitiva ou mista (Figura 15).

Figura 15 - O gráfico duplo-recíproco possibilita uma maneira fácil de determinar se o inibidor de uma enzima é competitivo, incompetitivo ou misto. a) Inibição competitiva; b) Inibição incompetitiva; c) Inibição mista.



### 3.6. TIROSINASE

A tirosinase é uma glicoproteína presente na membrana melanossomal que apresenta três domínios: um interno, que corresponde a região catalítica, contendo resíduos de histidina, as quais se ligam íons cobre; um transmembrana e um citoplasmático que participa no transporte da enzima para os melanossomas (SCHALLREUTER et al., 2008) (BHATIA et al., 2009). Ela é conhecida como a “enzima-chave” da biossíntese da melanina, pigmento que confere a cor ao cabelo, à pele e aos olhos e que exerce uma função fundamental na proteção da pele contra os raios UV (ZAIDI et al., 2014).

O mecanismo de ação da tirosinase depende da natureza dos íons de cobre, assim dependendo da valência do íon cobre e da ligação ao oxigênio molecular, o sítio ativo da tirosinase pode existir em três estados intermediários: desoxi ( $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Cu}^{\text{I}}$ ), oxi ( $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{O}_2-\text{Cu}^{\text{II}}$ ) e met ( $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{Cu}^{\text{II}}$ ). A forma met (Emet) é convertida para a forma desoxi (Edesoxi) pela redução de dois elétrons que capaz de fixar reversivelmente o oxigênio molecular, levando à forma oxi (Eoxi) (CABANES et al., 2002)

As proteínas de tirosinase presentes nas células estão principalmente na forma Emet, também denominada forma de repouso, a qual é incapaz de se ligar ao oxigênio molecular. Esta forma não catalisa a tirosina (monofenóis), mas tem afinidade para se ligar a ela, resultando em um período de repouso da enzima, no qual há interação química, porém não há catálise (CABANES et al., 2002).

Uma porção desta enzima, na forma Eoxi, reage com monofenóis, gerando difenóis, restituindo lentamente a enzima à forma Edesoxi, (Figura 16). Contudo, o aumento subsequente no nível de difenóis (p. ex.: L-DOPA) produz um maior recrutamento de Edesoxi, pois os difenóis podem reagir com Eoxi gerando Emet e conseqüentemente reage com Emet gerando Edesoxi, o que favorece para que mais enzimas saiam da condição de sequestro (Met) e possam reagir com monofenóis. O L-DOPA (L-3,4-di-hidroxifenilalanina) é o responsável pelo recrutamento das enzimas que estão na condição de sequestro, pois reduz Met para Edesoxi (CABANES et al., 2002)

Schallreuter *et al* (2008) relatam que, além do L-DOPA, outras espécies doadoras de elétrons, como peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, ânion superóxido, óxido nítrico,

hidroxilamina, ditionito,  $\text{Fe}^{\text{II}}$  e ditioneitol podem reagir com a Emet. A tirosinase pode, então, apresentar atividade catecolase e peroxidase, uma vez que esta enzima pode fazer uso de ânion superóxido como substrato para a melanogênese e assim proteger os melanócitos contra essas espécies reativas de oxigênio (EROS) (SCHALLREUTER *et al.*, 2008).

Em humanos, mutações que inativam a tirosinase são responsáveis por albinismo oculocutâneo (albinismo tipo I), que é a forma mais grave do albinismo devido à ausência total de melanina (VIDEIRA *et al.*, 2013).

Por outro lado, maior exposição à radiação UV contribui com o aumento de ROS e conseqüentemente maior expressão de tirosinase como mecanismo de defesa contra estes contribuindo para o desenvolvimento de melanoma (uma das formas mais agressivas do câncer de pele) (WANG *et al.*, 2013). Por essa razão, inibidores da tirosinase têm sido utilizados como agentes despigmentantes para o tratamento ou prevenção de desordens envolvendo hiperpigmentação.

Nas últimas décadas, vários inibidores da tirosinase tais como compostos fenólicos têm sido estudados e esta grande quantidade de pesquisas realizadas, resultaram na descoberta de diversos tipos de inibidores incluindo arbutina, ácido kójico e hidroquinona (DERI *et al.*, 2016). Porém, a utilização de agentes existentes é bastante limitada e isso acontece devido à baixa estabilidade, atividade insuficiente, efeitos secundários, toxicidade elevada, e capacidade de penetração insuficiente (NERYA *et al.*, 2004).

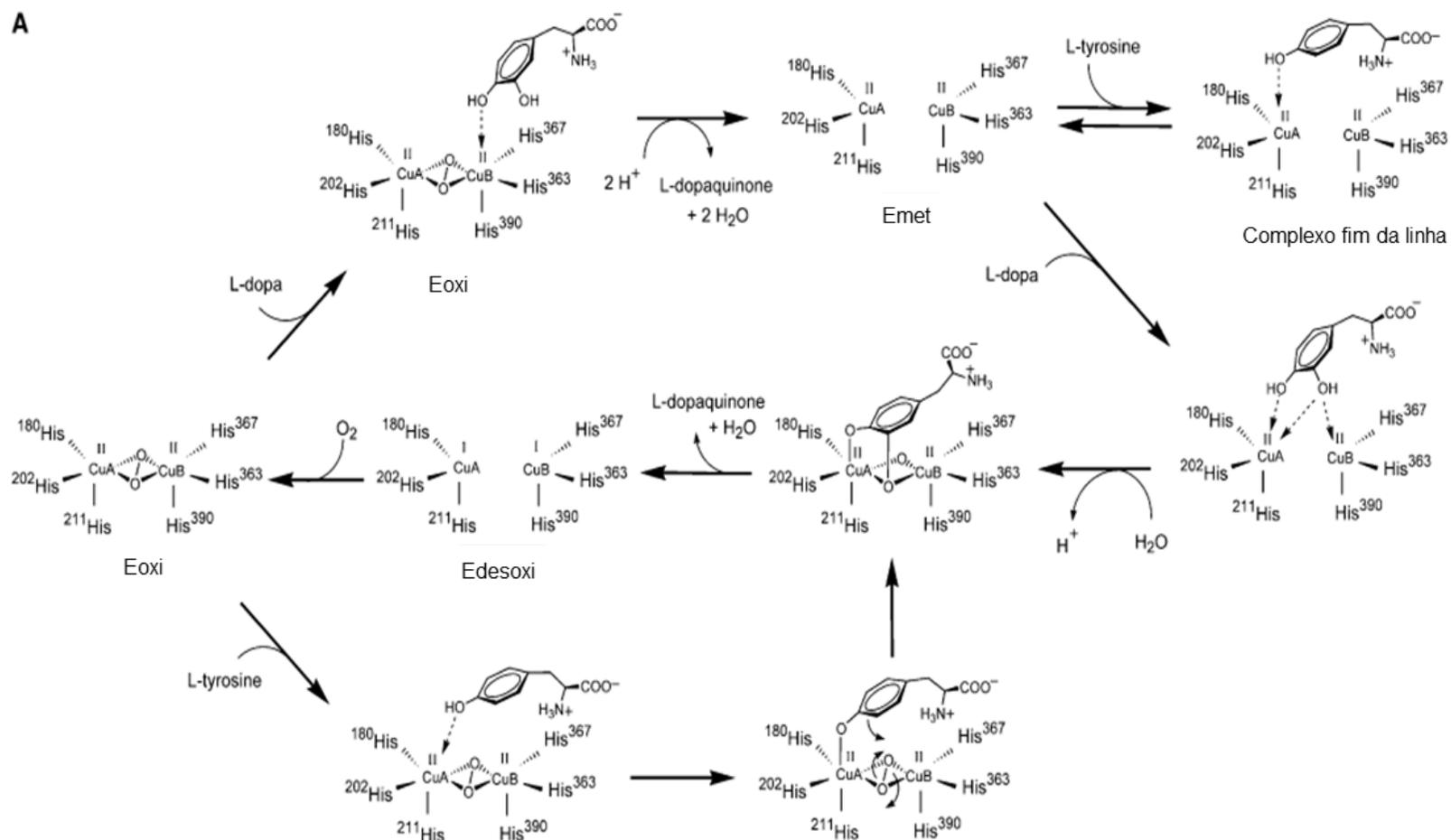
O ácido kójico, por exemplo, inibe competitivamente a etapa monofenolase da tirosinase, já na etapa difenolase desta enzima o ácido kójico atua como inibidor misto (SAGHAIE *et al.*, 2013) Desse modo, o mecanismo desempenhado por este agente envolve a afinidade pelo sítio ativo da enzima, onde há quelação dos íons  $\text{Cu}^{\text{II}}$  presentes, e a ligação em um sítio diferente do ativo, realizando inibição não-competitiva (SENDOVSKI *et al.*, 2011).

A literatura traz vários agentes, pertencentes a diferentes classes metabólicas, com possível atividade anti-tirosinase, como os apresentados na Tabela 1.

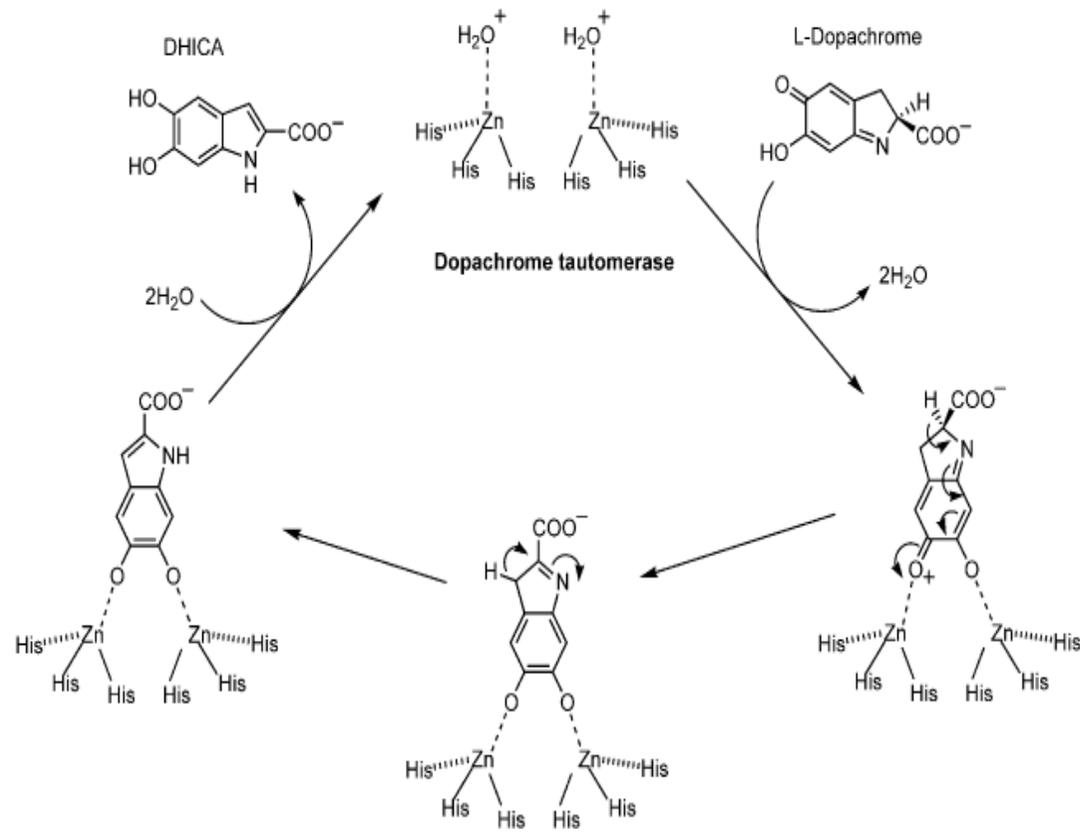
Tabela 1 - Agentes anti-tirosinase já reportados na literatura

SUBSTÂNCIA COM ATIVIDADE ANTI-TIROSINASE	REFERÊNCIA
Polifenóis (kaempferol, galangina e quercetina)	(KUBO et al., 2000)
Benzaldeídos e derivados de benzoatos (ác. Gálico, ácido benzóico, anísico, anisaldeído, ácido cinâmico e ácido metoxicinâmico).	(PIAO et al., 2002); (KUBO et al., 2003)
Lipídios de cadeia longa (triacilglicerol e trilinoleína)	(JEON et al., 2006)
Fitoesterróis	(SABUDAK et al., 2006)
Antraquinonas	(LEU et al., 2008)
Inativadores irreversíveis (cloreto de cetilpiridínio, 3,5-dihidroxifenil-decanoato).	(CHEN et al., 2003); (QIU et al., 2005)

Figura 16 - (A) Mecanismo para atividade de monofenolase e difenolase da tirosinase. (B) Mecanismo da enzima dopachrome tautomerase e a transformação do dopacromo em DHICA (ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico) um intermediário na biossíntese da melanina.



B



As tirosinases são amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais, entretanto, a identidade das sequências genéticas, a estrutura e a região do sítio ativo são conservadas entre as diferentes espécies. Estudos são direcionados para a tirosinase de cogumelos um modelo promissor para se obter maiores informações sobre a estrutura e suas propriedades enzimáticas (CLAUS e DECKER, 2006), tais estudos podem ser usados como base para diversas aplicações biotecnológicas (HALAOULI et al., 2006).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ASPECTOS GERAIS**

Os solventes: metanol, etanol, dimetilformamida e tetrahidrofurano utilizados nas sínteses dos ligantes e complexos e os demais reagentes comerciais, hidrazida benzoica, trietilamina, acetilacetato de vanádio(IV) ( $\text{VO}(\text{acac})_2$ ) e pentóxido de vanádio(V) ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), foram usados sem tratamento prévio. As reações de síntese dos ligantes foram conduzidas sem controle de atmosfera inerte e os procedimentos de cristalização foram realizados através da lenta evaporação do solvente.

### **4.2. PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE**

#### **4.2.1. MATERIAIS E SÍNTESE DOS LIGANTES (L1AS-L5AS E L1P-L5P)**

As hidrazidas utilizadas foram sintetizadas a partir da esterificação do ácido 4-hidróxibenzoico, ácido 4-metilbenzoico, ácido benzoico, ácido 4-nitrobenzoico e 4-aminobenzoico, seguido da hidrazinólise desse éster com hidrato de hidrazina, realizada anteriormente em nosso laboratório. Os ligantes apresentam estruturas parecidas, uma vez que foram sintetizados a partir da mesma hidrazida, com diferentes substituições em orientação para.

Os ligantes desse trabalho foram sintetizados diversas vezes ao longo da dissertação, dessa forma o procedimento sintético foi otimizado e os rendimentos otimizados, com rendimentos variando de 78%-97%.

##### **4.2.1.1. Procedimento experimental para a síntese dos ligantes.**

Os ligantes L1AS-L5AS foram sintetizados usando um balão de fundo redondo munido de agitação magnética, solubilizou-se 0,05g (1 equivalente) das hidrazidas: 4-hidroxibenzohidrazida (L1AS), 4-metilbenzohidrazida (L2AS), benzohidrazida (L3AS), 4-aminobenzohidrazida (L4AS) e 4-nitrobenzohidrazida (L5AS) em 15 mL de metanol.

Adicionou-se 1 equivalente do aldeído salicílico para formação dos ligantes L1AS ao L5AS (35uL, 35uL, 29uL, 36uL e 39uL, respectivamente) e 1 equivalente do cloridrato de piridoxal do L1P ao L5P (0,0676g, 0,0685g, 0,0568g, 0,068g e 0,0756, respectivamente), e agitou-se a mistura resultante em temperatura (70°C) constante em sistema aberto durante três horas (Figura 17).

L1AS, L2AS, L4AS e L5AS foi possível obter após evaporação lenta sem a presença de precipitado. Já os ligantes L3AS, L1P, L2P, L3P, L4P, L5P obtiveram precipitado durante a reação que foi retirado por meio de uma filtração simples e armazenado, o produto final, após evaporação lenta do solvente, foram cristais de cor amarelada que foram recolhidos e confirmados através da técnica de difração de raio X em monocristal e espectroscopia de absorção eletrônica na região UV/Vis.

Tabela 2 - Códigos dos ligantes e rendimentos de acordo com seus substituintes.

Ligantes	L1AS	L2AS	L3AS	L4AS	L5AS	L1P	L2P	L3P	L4P	L5P
R	OH	CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	NO <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>
Rend. %	85	79	93	78	91	97	80	85	91	96

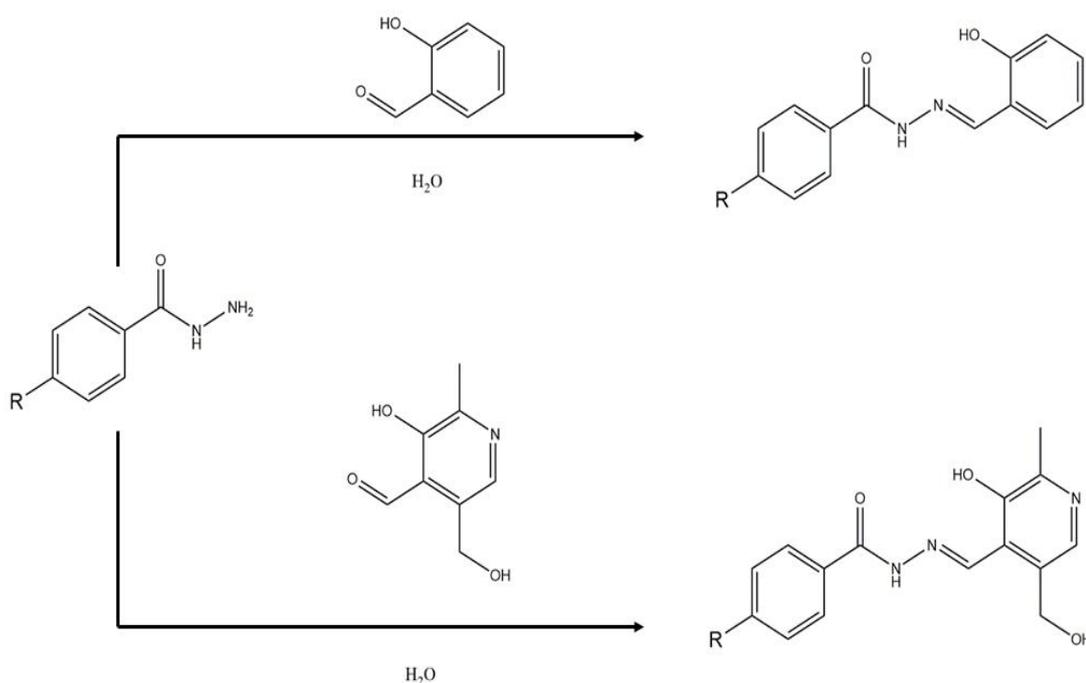
#### 4.2.2. MATERIAIS E SÍNTESE DOS COMPLEXOS (C1AS-C5AS E C1P – C5P)

Sintetizaram-se os complexos utilizando o ligante previamente sintetizado e diferentes compostos de vanádio. Utilizaram-se reagentes comerciais sem tratamento prévio. Como solvente, utilizaram-se metanol e etanol absoluto sem tratamento prévio. Obtiveram-se monocristais adequados para difração de raios X dos complexos sintetizados por meio de evaporação lenta do solvente.

Para obter os complexos C1AS, C2AS, C3AS, C2P, C3P, C4P e C5P (Figura 18) foram sintetizados a partir dos respectivos ligantes (L1AS, L2AS, L3AS, L2P, L3P, L4P e L5P). Adicionou-se 0,2 mmol de cada ligante solubilizados em 10 mL de seus respectivos solventes como demonstrado na tabela 2. À suspensão do ligante adicionou-se uma base (Tabela 3) como agente desprotonante. Posteriormente, adicionou-se acetilacetato de vanádio(IV) 0,2 mmol. Agitou-se a mistura com agitação magnética e temperatura (70°C) constantes por duas horas em sistema aberto. Após sete dias de evaporação lenta do solvente, obtiveram-se monocristais de coloração dourada adequados para difração de raios X. Apesar do uso do composto

$\text{VO}(\text{acac})_2$  com número de oxidação igual a +4, todos os complexos desse trabalho apresentarem número de oxidação +5, o que demonstra uma facilidade da vanadila  $\text{VO}^{2+}$  em se oxidar para dióxido de vanádio com número de oxidação +5. Apesar do óxido de vanádio ser insolúvel em solventes orgânicos, a reação não foi prejudicada, visto que após adição desse composto à reação inicial de coloração amarelo claro (ligante) a solução restante permaneceu com uma coloração amarelo escuro sem a formação de precipitado dando indícios que o vanádio não permaneceu como óxido de vanádio e se complexou com o ligante da solução.

Figura 17 - Esquema simplificado dos dois ligantes utilizados nesse trabalho.



Por outro lado, para a obtenção dos complexos C4AS, C5AS e C1P foram utilizados 0,2 mmol dos ligantes (L4AS, L5AS E L1P, respectivamente) solubilizados em seus respectivos solventes (Tabela 3). A síntese procedeu de maneira similar aos complexos descritos anteriormente, porém o composto de vanádio utilizado foi o pentóxido de vanádio(V), 0,2mmol. O pentóxido de vanádio, apesar de ser muito insolúvel, não se apresentou como um problema para a realização da síntese, uma vez que ao ser adicionado base à reação a solução voltou a ser de coloração amarelada e límpida.

Figura 18 - Esquema simplificado dos tipos de complexos esperados.

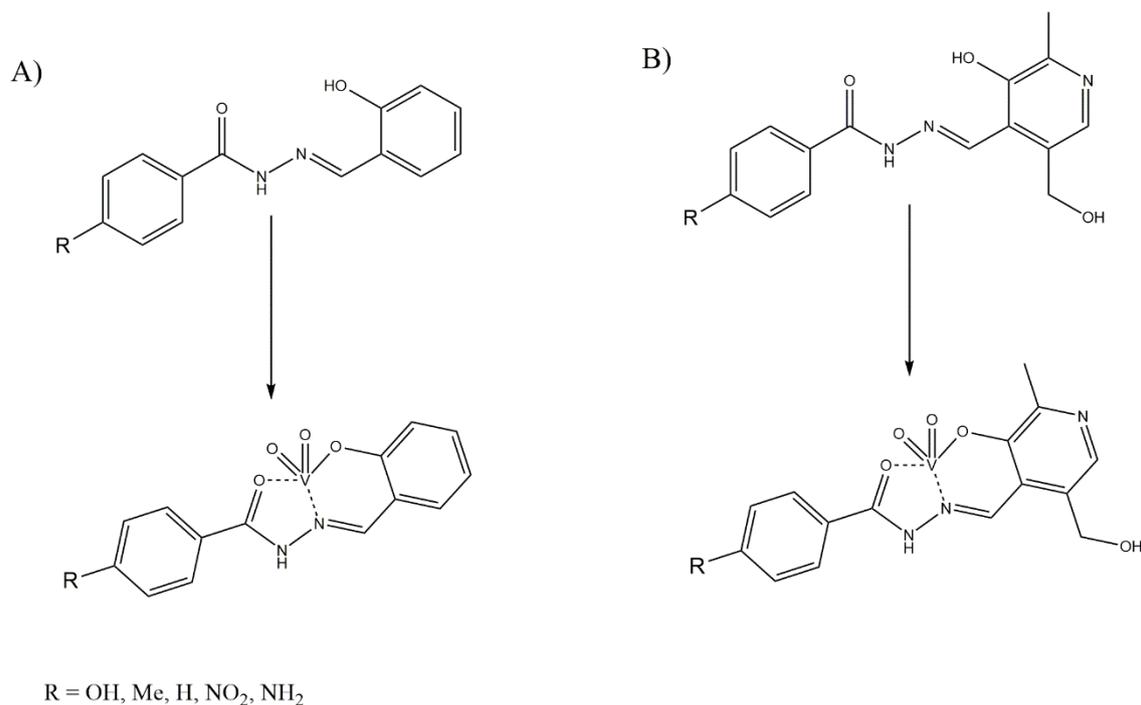


Tabela 3 - Apresentação dos diferentes solventes e bases utilizado na síntese de cada complexo

COMPLEXO	SOLVENTE	BASE	COMPOSTO DE VANÁDIO
C1AS	Etanol (10mL)	Trietilamina	VO(acac) <sub>2</sub>
C2AS	Etanol (10mL)	Trietilamina	VO(acac) <sub>2</sub>
C3AS	Etanol (10mL)	Trietilamina	VO(acac) <sub>2</sub>
C4AS	Metanol (10mL)	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
C5AS	Metanol (10mL)	Trietilamina	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
C1P	Etanol (10mL)	Trietilamina	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

C2P	Etanol (10mL)	Trietilamina	VO(acac) <sub>2</sub>
C3P	Metanol (10mL)	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno	VO(acac) <sub>2</sub>
C4P	Etanol (10mL)	Trietilamina	VO(acac) <sub>2</sub>
C5P	Etanol (10mL)	Trietilamina	VO(acac) <sub>2</sub>

Para se determinar o tempo reacional de complexação a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até o desaparecimento dos materiais de partida. Todos os complexos foram testados primeiramente com o composto VO(acac) e sem a utilização de base. Após, foram testados com diferentes bases (trietilamina e após 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno) e solventes, partindo de etanol e posteriormente metanol. Quando não houve sucesso na síntese com esses outros fatores foi modificado o composto de vanádio para V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e repetido os testes de mudança de bases e solventes.

O rendimento observado para os complexos foi determinado pela massa dos cristais obtidos após serem retirados do frasco que estava contida a solução para a evaporação (Anexo 1).

#### 4.3. DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM MONOCRISTAL

Realizou-se a coleta de dados (Anexo 2) nos difratômetros *Bruker® D8 VENTURE Photon 100* pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Para tanto, utilizou-se no *VENTURE* radiação de molibdênio ou radiação de prata monocromatizadas por monocromador de grafite e geradas por tubo de alto brilho *Incoatec® IμS* (K $\alpha$  Mo= 0,71073 Å; K $\alpha$  Ag = 0,56086 Å).

A partir dos dados coletados, elucidaram-se as estruturas dos ligantes e complexos sintetizados por método direto empregando programa *SHELXS-2008®*. Realizaram-se todos refinamentos por meio de método de matriz completa/mínimos quadrados dos fatores estruturais (F<sup>2</sup>), com os parâmetros de deslocamento térmico anisotrópico para todos os átomos diferentes de hidrogênio utilizando pacote *SHELXS-2008®*. Obteve-se a posição dos átomos diferentes de hidrogênio por meio de sucessivas diferenças de *Fourier* e refinamentos com

parâmetros anisotrópicos. Refinaram-se os átomos de hidrogênio na forma de grupos vinculados geometricamente aos respectivos átomos diferentes de hidrogênio. Obtiveram-se as projeções estruturais por meio dos programas *ORTEP-3*<sup>®</sup> e *DIAMOND 4.5.2*<sup>®</sup> para *Windows*<sup>®</sup>. Utilizou-se o programa *Mercury 4.1.0*<sup>®</sup> para *Windows*<sup>®</sup> para a observação das estruturas cristalográficas.

#### 4.4. PONTO DE FUSÃO

Realizaram-se os experimentos para obtenção dos pontos de fusão de ligantes e complexos utilizando aparelho digital Micro Química<sup>®</sup> modelo MQAPEF-301, pertencente ao Laboratório de Materiais Inorgânicos (LMI) da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 4.5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NA REGIÃO UV/VIS

Realizaram-se as avaliações de estabilidade em solução e obtenção dos espectros de absorção eletrônica na região do UV/Vis e valores de *épsilon* ( $\epsilon$  = absortividade molar) de ligantes e complexos sintetizados utilizando aparelho *Shimadzu*<sup>®</sup> UV-Vis 1650-PC, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Realizaram-se os experimentos sem controle de temperatura na região compreendida entre 220-800 nm e utilizando cubetas de quartzo de quatro faces com caminho óptico de 1 cm. Empregaram-se os solventes: N,N'-dimetilformamida (DMF) solvente para os ligantes e dimetilsulfóxido (DMSO) para os complexos.

#### 4.6. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Obtiveram-se os espectros de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR) dos ligantes e dos complexos sintetizados utilizando aparelho *Bruker*<sup>®</sup> VERTEX 70 em janela espectral de 4000-300  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos no modo transmitância. Utilizaram-se códigos em inglês para indicar a intensidade das bandas: *br* (*broad*), larga; *s* (*strong*), forte; *m* (*medium*), média e *w* (*weak*), fraca.

#### 4.7. VOLTAMETRIA CÍCLICA

As medidas voltamétricas foram feitas em um Potenciostato/Galvanostato EcoChemie AutoLab PGSTAT 32N, localizado na Universidade Federal de Santa Maria, em solução de

DMF, utilizando hexafluorofosfato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte (0,1 mol L<sup>-1</sup> em solução de DMF). Estes experimentos foram realizados empregando um sistema padrão de três componentes: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo; um eletrodo auxiliar (fio de platina) e um eletrodo de pseudo-referência de platina. Para monitorar o eletrodo de referência, o par redox (Fc<sup>+</sup>/Fc = 0,64 V vs SHE) foi utilizado como referência interna, e os voltamogramas estão expressos em função do mesmo.

#### 4.8. ENSAIO ENZIMÁTICO

O potencial inibitório da enzima tirosinase foi realizada de acordo com Kubo *et al* (2000a) com modificações para placa de 96 poços. As soluções foram preparadas em tampão fosfato salina (PBS) pH 6,9. No entanto, tanto os ligantes quanto os foram solubilizadas previamente em DMSO, de modo que a concentração final de DMSO no poço fosse de 5%. Todas as reações tiveram uma concentração final de 20 U mL<sup>-1</sup> da enzima tirosinase, 10 mmol L<sup>-1</sup> de L-tirosina e concentrações dos ligantes e complexos de 0,1; 0,08; 0,06 e 0,04 M. As reações foram iniciadas pela adição da enzima com o uso de pipetador multicanal e a velocidade da reação (formação de dopacromo) avaliada com um leitor de microplaca com filtro de 492 nm.

Como controle também foi realizada a incubação apenas da enzima com o ácido kójico, para demonstrar que estes na ausência do substrato não geram variação na absorvância ao longo do tempo.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rota sintética utilizada para obter os ligantes foi proposta por Siqueira e colaboradores. Além disso, a otimização da rota sintética para a síntese dos ligantes foi otimizada anteriormente pelo laboratório (SIQUEIRA et al., 2020).

Esta discussão está dividida em três partes: a primeira discorrerá sobre a caracterização estrutural dos compostos sendo que, esta parte ficou subdividida em espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia na região do ultravioleta e visível, a segunda será sobre os resultados cristalográficos dos complexos. A última parte trata dos resultados dos potenciais inibitórios frente a enzima tirosinase.

## 5.1. PARTE 1: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS

### 5.1.1. RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Foram realizadas as caracterizações de espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de *Fourier (FT-IR)* de todos os complexos. Nesta seção, serão mostrados e discutidos os resultados obtidos. Os espectros foram obtidos no modo transmitância.

A análise dos espectros no infravermelho consistiu em investigar a presença de bandas que indicassem a formação da função imina C=N, de média intensidade e/ou da amina secundária e conseqüentemente, a ausência de bandas características de aminas primárias dos materiais de partida.

As bandas de estiramento relacionadas aos sítios de coordenação quando coordenados apresentam diferentes valores de número de onda em relação aos mesmos quando não-coordenados.

Tal técnica indica a protonação dos nitrogênios piridínicos do anel do piridoxal pela banda de estiramento (Npir-H) em aproximadamente  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Assim, foi possível verificar que os complexos (C1P, C2P, C3P, C4P, C5P) estão na forma iônica.

Os complexos também apresentam bandas de baixa intensidade de estiramentos simétrico e assimétrico das duas ligações V=O na região mais distante do infravermelho, com números de onda variando de  $970\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu(\text{VO}_2)$  simétrico e  $900\text{-}854\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu(\text{VO}_2)$  assimétrico), respectivamente.

Além disso, é possível observar bandas dos estiramentos O-H dos grupos álcool benzílico do piridoxal.

Os números de onda (em  $\text{cm}^{-1}$ ) das bandas dos estiramentos de ligantes e de complexos estão na Tabela 4 e 5. Os espectros de espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos ligantes e dos complexos estão no ANEXO 4.

Tabela 4 - Número de onda das principais bandas dos estiramentos características dos ligantes.

Ligantes	O-H	C=N	N <sub>pir</sub> -H
L1AS	3442	1610	-
L2AS	3374	1621	-
L3AS	3269	1673	-
L4AS	3211	1647	-
L5AS	3463	1592	-
L1P	3418	1599	1555
L2P	3332	1670	1543
L3P	3340	1680	1566
L4P	3444	1609	-
L5P	3449	1605	1549

Fonte: Siqueira

Tabela 5 - Número de onda das principais bandas dos estiramentos características dos complexos.

Complexos	O-H	C=N	V=O assimétrico	V=O simétrico
C1AS	3097	1601	861	920
C2AS	3382 (metanol)	1611	880	906
C3AS	-	1606	882	945
C4AS	-	1612	851	892
C5AS	3381	1603	-	908
C1P	3423	1645	-	-
C2P	3394	1607	-	967
C3P	3364	1596	907	935
C4P	3045	1586	900	955
C5P	3134	1541	-	915

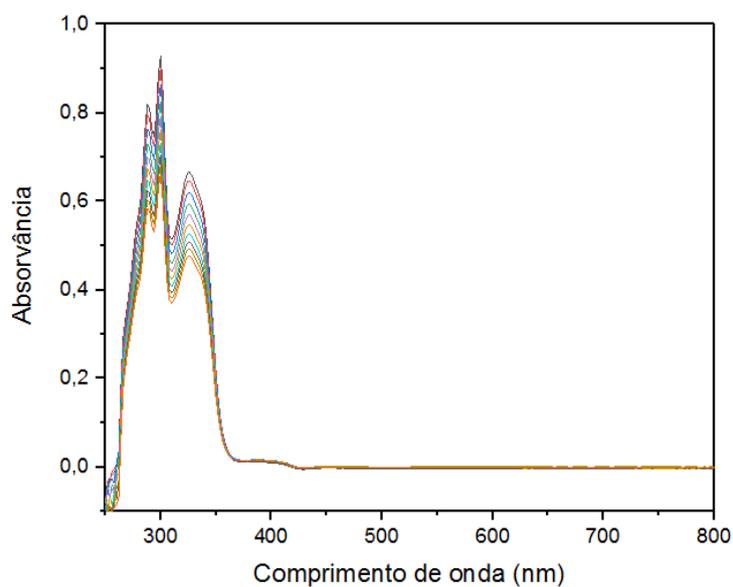
### 5.1.2. RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NA REGIÃO UV/VIS

Serão mostrados e discutidos os espectros de absorção eletrônica na região do UV/Vis de um ligante (SIQUEIRA et al., 2020) e um complexo uma vez que estes apresentam espectros com perfil semelhantes, possuindo bandas semelhantes. Os espectros de espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV/Vis dos complexos estão mostrados no ANEXO 3.

O espectro de absorção eletrônica em solução de DMF do ligante **L5P** está na demonstrado na Figura 19. Os espectros de absorção dos ligantes são similares, apresentando bandas em torno de 300 nm que pode ser atribuída a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  referente a ligações

duplas ressonância do anel, e bandas em 350 nm, referente a transições intraligantes o tipo  $n \rightarrow \pi^*$  referente ao grupamento C=O.

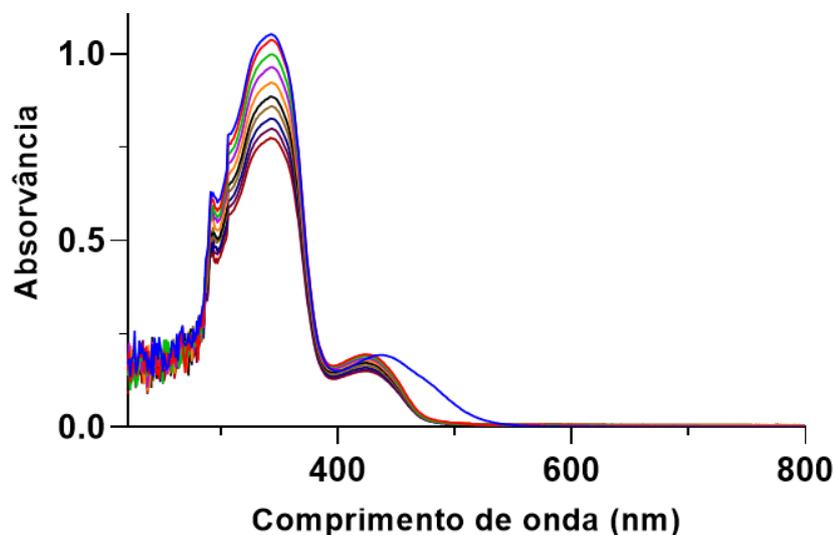
Figura 19 - Espectro de absorção eletrônica do ligante L5P.



Fonte: Siqueira

Nos espectros dos complexos obtidos é possível observar bandas na faixa de 350 nm a 550 nm presentes, igualmente, nos espectros dos ligantes. Se considerarmos a natureza dos ligantes é possível atribuir essas bandas a transições eletrônicas do tipo transferência de carga, sendo provável bandas do tipo transferência de carga Ligante-Metal (TCLM) observadas na faixa de 380 nm a 500 nm. Na figura 20 vemos o espectro do complexo C5P em DMSO e as bandas características do ligante e o a banda referente ao TCLM com pico de absorvância em 436 nm. Os valores de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) foram calculados pela regressão linear no comprimento de 343 nm (maior pico de absorvância).

Figura 20 - Espectro de absorção eletrônica do complexo C5P.



Os valores de comprimento de onda relativos à absorvância máxima das bandas dos complexos estão mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de comprimento de onda relativos à absorvância máxima das bandas dos complexos.

COMPLEXOS	$\pi \rightarrow \pi^*$	$n \rightarrow \pi^*$	TCLM	$\epsilon$ Máximo Mol.L <sup>-1</sup>
C1AS	291	327	403	11104
C2AS	292	325	403	12628
C3AS	291	325	404	16103
C4AS	291	336	426	22077
C5AS	290	346	410	11967
C1P	293	345	423	21377
C2P	291	339	415	11470
C3P	291	342	418	
C4P	292	352	430	
C5P	291	343	436	

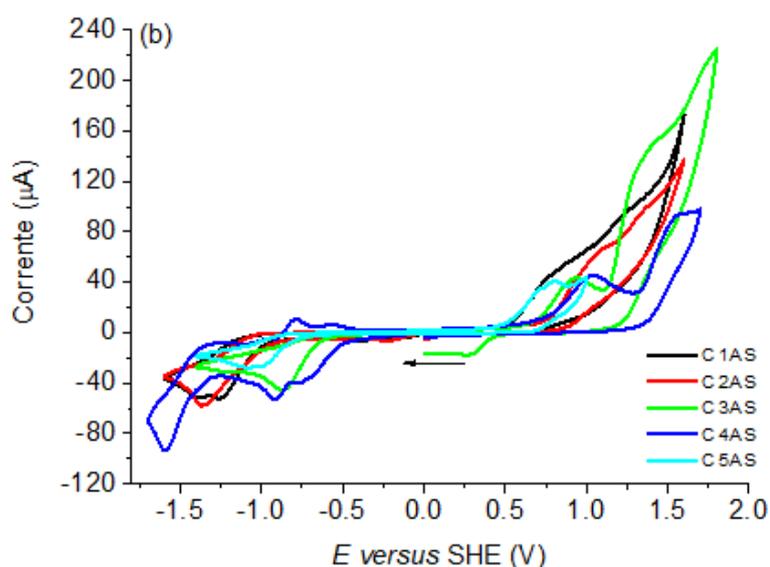
### 5.1.3. VOLTAMETRIA CÍCLICA

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica para observar a presença de processos de oxidação e/ou de redução dos complexos com concentrações de 10  $\mu$ M sobre a superfície do eletrodo de TBAPF<sub>6</sub> (0,1 M) e velocidade de varredura de 100 mV/s. Pela figura 21 observa-se os picos de redução dos íons de V<sup>v</sup>  $\rightarrow$  V<sup>iv</sup> (Ered2) e a re-oxidação do vanádio V<sup>iv</sup>  $\rightarrow$  V<sup>v</sup> (Eox1).

De acordo com a Tabela 7, os valores apresentados são interessantes, pois mostram uma relação direta dos potenciais redox com a atividade inibitória perante a enzima tirosinase. O complexo C1AS possui o menor pico de Ered2 e apresenta a melhor I%, já o C1P obteve o maior pico de Eox1 e não apresentou nenhuma atividade inibitória. Já os respectivos ligantes tiveram atividade contrária, enquanto que o C1AS teve oxidação e redução do ligante (L1AS) e este não apresentou atividade inibitória, o C1P não teve oxidação do ligante L1P, mas dentre todos os ligantes ele foi o que apresentou maior I%.

Desse modo, pode-se sugerir que o centro metálico do C1AS é responsável pela atividade inibitória do complexo, já no C1P o íon vanádio não favorece essa atividade, uma vez que o ligante sozinho apresenta a melhor atividade.

Figura 21 - Voltametria cíclica dos complexos de vanádio (a) C1P-C5P e (b) C1AS-C5AS, em solução de DMF, utilizando solução 0,1 M de TBAPF<sub>6</sub> como eletrólito suporte e velocidade de varredura de 100 mV/s.



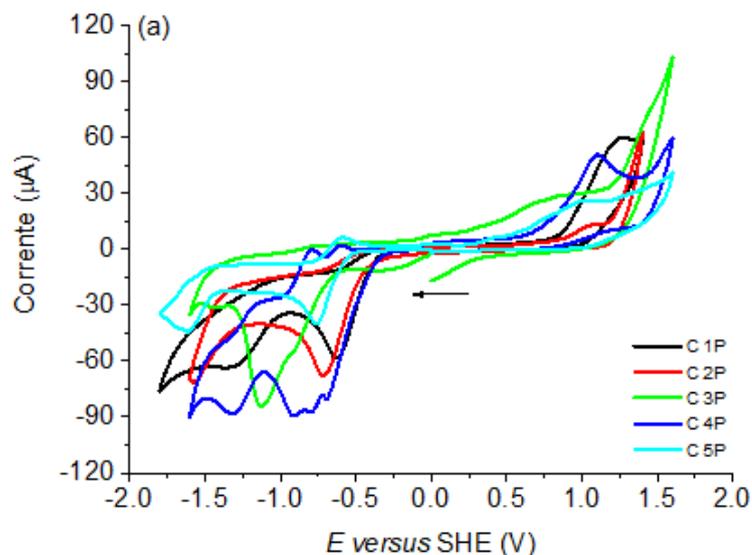


Tabela 7 - Potenciais redox dos complexos de vanádio em solução de DMF (E versus SHE).

Composto	$E_{red1}$	$E_{red2}$	$E_{ox1}$	$E_{ox2}$
<b>C1P</b>	-1,30 V	-0,62 V	+1,25 V	-----
<b>C2P</b>	-1,57 V	-0,71 V	+1,05 V	-----
<b>C3P</b>	-1,34 V	-1,12 V	+0,77 V	+1,40 V
<b>C4P</b>	-1,31 V	-0,80 V	+1,10 V	-----
<b>C5P</b>	-1,61 V	-0,76 V	+1,00 V	-----
<b>C1AS</b>	-1,39 V	-1,26 V	+0,75 V	+1,22 V
<b>C2AS</b>	-1,37 V	-----	+1,06 V	+1,35 V
<b>C3AS</b>	-1,20 V	-0,86 V	+0,92 V	+1,34 V
<b>C4AS</b>	-1,59 V	-0,92 V	+1,03 V	+1,54 V
<b>C5AS</b>	-1,05 V	-----	+0,70 V	+0,80 V

## 5.2. PARTE 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO CRISTALOGRÁFICA.

### 5.2.1. RESULTADOS CRISTALOGRÁFICOS GERAIS

A apresentação e discussão de resultados referente à análise de difração de raios X será efetuada em blocos. Os compostos foram agrupados pelo grupo espacial em comum.

Os resultados cristalográficos dos complexos foram obtidos a partir da análise de raio X de monocristal e os parâmetros cristalográficos estão descritos no ANEXO 2. Os complexos apresentam sistemas cristalinos distintos, bem como grupo espacial como descrito na Tabela 8.

Estes valores estão de acordo com os valores encontrados na literatura para ligações V-N(imina), V-O(fenolato) e V-O(carbonila) (MAURYA et al., 2010). Todos os complexos sintetizados apresentam um átomo de V central com geometria bipirâmide trigonal e número de oxidação 5+.

Tabela 8 - Parâmetros cristalográficos gerais para os complexos sintetizados.

Complexos	Sistema cristalino	Grupo espacial	Ligações [Å]		
			V-N (N imínico)	V-O (fenolato)	V-O (carbonila)
C1AS	Monoclínico	$P2_1/c$	2.1515(13)	1.8681(13)	1.9974(12)
C2AS	Monoclínico	$P2_1/n$	2.1248(15)	1.8407(14)	1.9401(13)
C3AS*	Ortorrombico	$Pbca$			
C4AS	Monoclínico	$C 1 c 1$	2.122(3)	1.908(4)	1.976(3)
C5AS	Monoclínico	$P12_1 1$	2.1468(15)	1.8938(15)	1.9630(13)
C1P	Triclínico	$P\bar{1}$	2.145(3)	1.923(2)	1.963(2)
C2P**	Monoclínico	$P2_1/c$			
C3P	Ortorrombico	$P212121$	2.1610(18)	1.9134(18)	1.9526(16)
C4P	Monoclínico	$P 1 21/n 1$	2.1665(15)	1.9022(14)	1.9598(14)
C5P	Monoclínico	$P2_1/c$	2.158(3)	1.916(2)	1.952(3)

Os complexos contendo aldeído salicílico diferenciam-se dos complexos contendo piridoxal pela presença de um íon de trietilamônio que serve como contra íon. Como observado na figura 22 temos a exemplificação de um complexo AS e seus contra íon e um complexo P.

Há exceção no C1AS onde observa-se a protonação do grupo hidrazina dispensando, então, a necessidade de um íon para o balanceamento das cargas como mostrado na figura 23.

Figura 22 - Complexo C5AS com trietilamônio como contra íon.

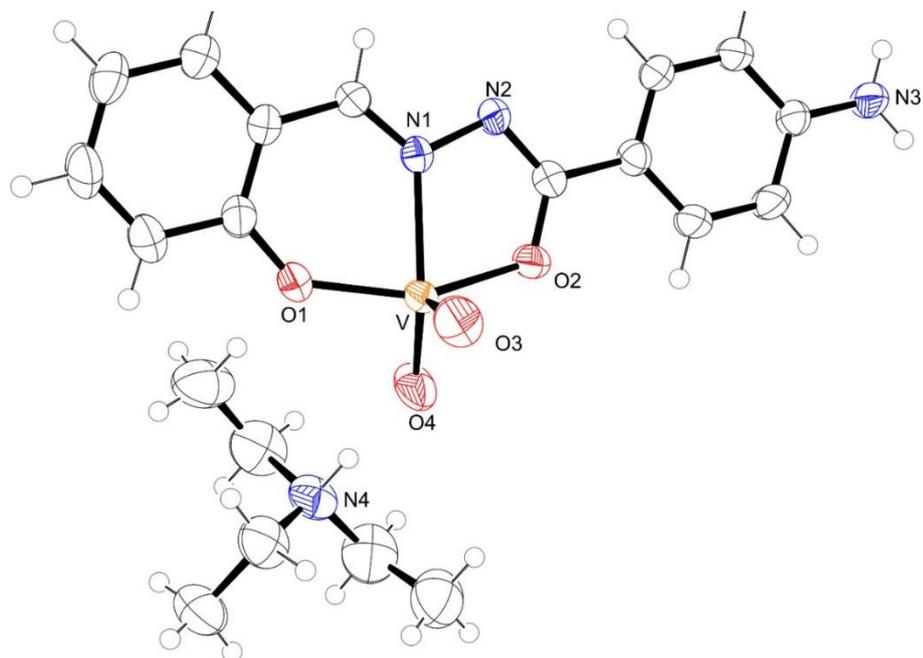
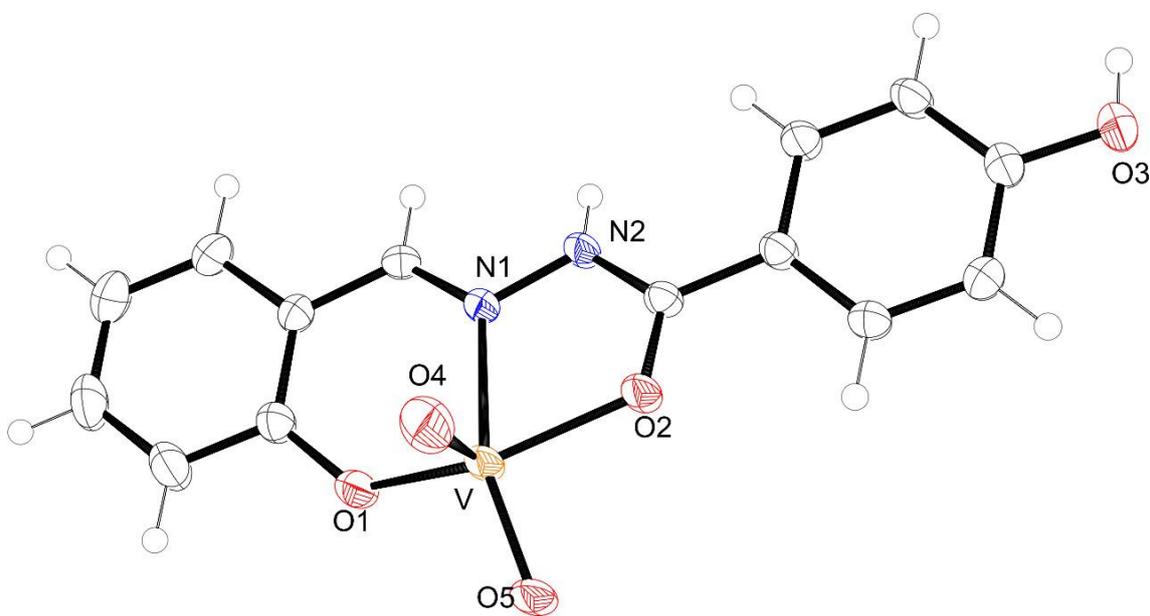


Figura 23 - Complexo C1AS onde dispensa a necessidade de um contra íon, uma vez que houve a protonação do grupo hidrazina.



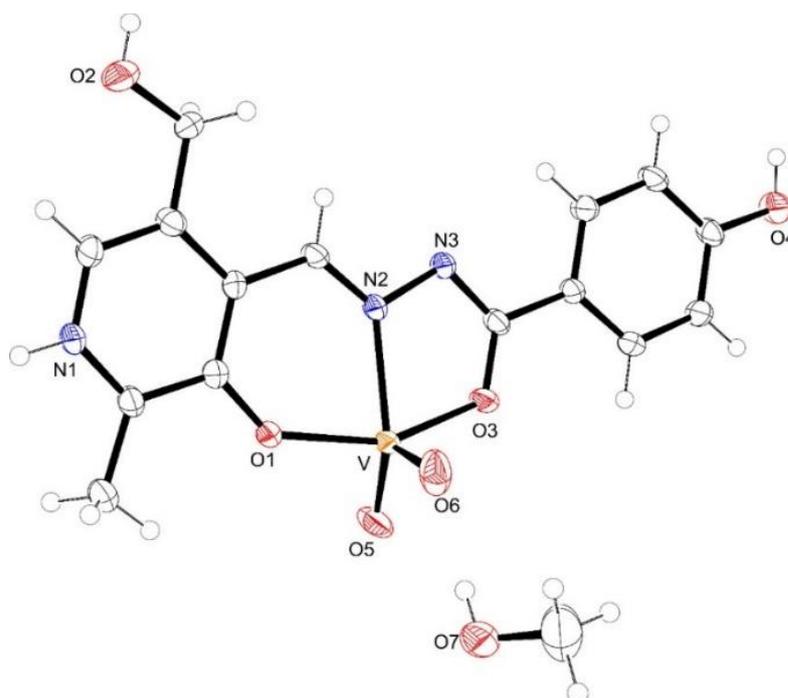
## 5.2.2. SISTEMA CRISTALINO TRICLÍNICO

Existem apenas dois grupos de espaços triclínicos e estes recebem os símbolos  $P1$  e  $P\bar{1}$ ; o primeiro é enantiomórfico, enquanto o último é centrosimétrico.

### 5.2.2.1. Grupo espacial $P\bar{1}$

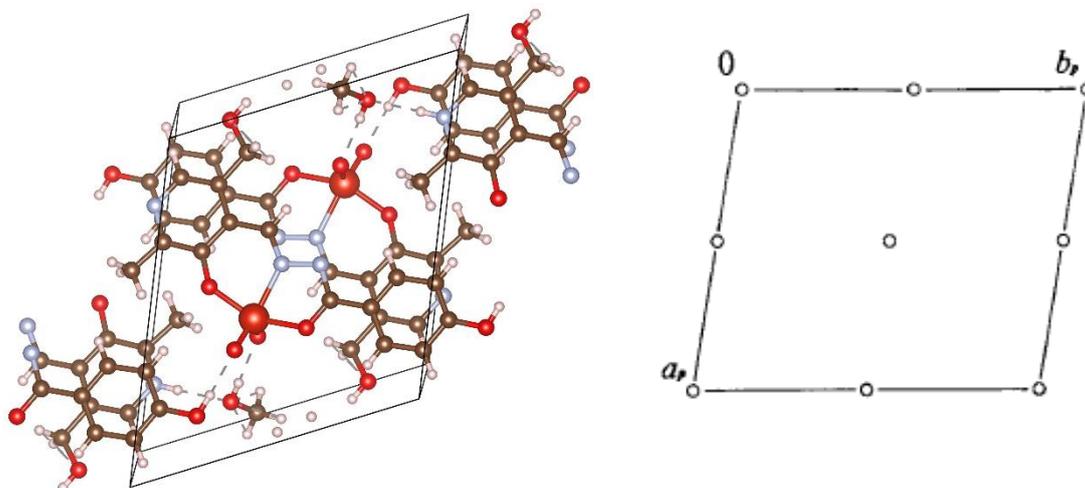
A análise de raios X do complexo C1P em monocristal mostrou que esse complexo cristalizou no sistema triclínico, grupo espacial centrosimétrico  $P\bar{1}$  (n° 2 da *International Tables of Crystallography*). De acordo com as condições de reflexão da classe integral ( $hkl$ ) das reflexões coletadas observou-se a ausência de uma sistemática nas reflexões, fato que indicou um tipo de Bravais  $P$  para a cela unitária (Figura 24).

Figura 24 - Projeção da estrutura molecular do complexo C1P. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.



A imagem 25 apresenta o aferimento da projeção da cela unitária do complexo **C1P** no plano  $ab$  e os operadores de simetria pelo pictograma da *International Tables for Crystallography* no mesmo plano de projeção gráfico, o grupo espacial  $P\bar{1}$ , exibe duas posições equivalentes de simetria dentro da cela unitária devido à presença do ponto de inversão.

Figura 25 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C1P (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita).

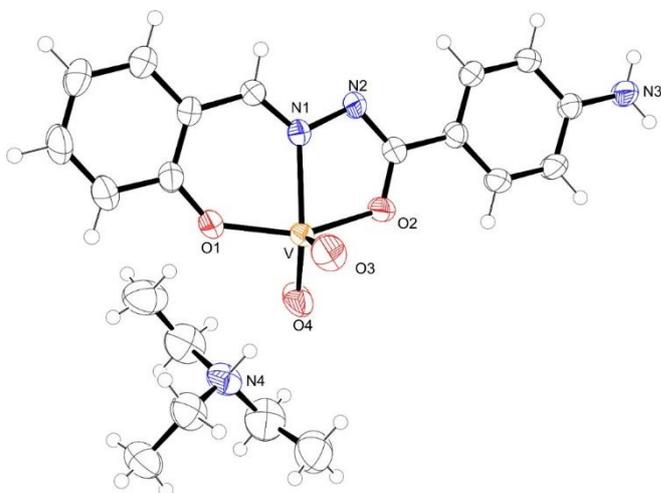


### 5.2.3. SISTEMA CRISTALINO MONOCLÍNICO

#### 5.2.3.1. Grupo espacial $P12_11$

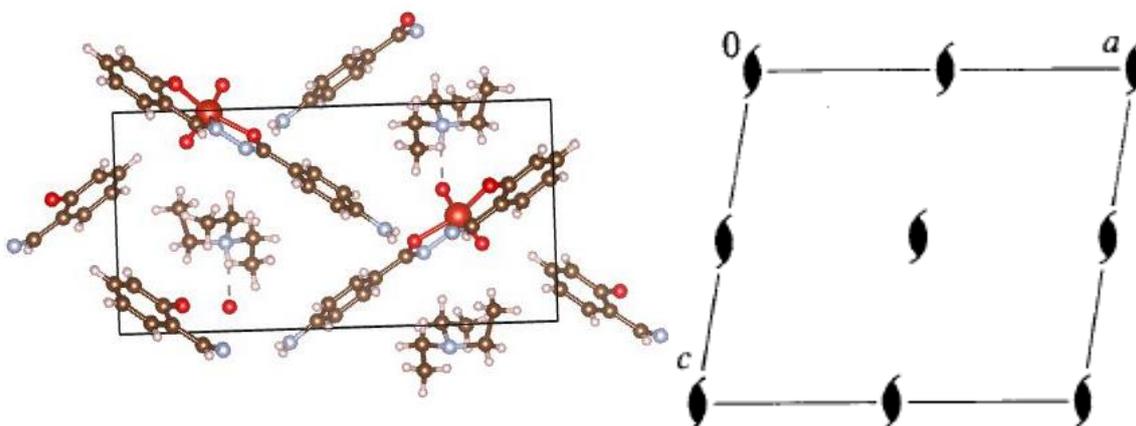
O complexo C5AS, através dos dados de reflexão obtidos pela difração de raio X ( $0k0$  :  $k = 2n$ ), resolveu-se no grupo espacial  $P12_11$  (n° 4 da *International Tables of Crystallography*) não centrossimétrico e foi obtido através do ligante L5AS como descrito anteriormente (Figura 26).

Figura 26 - Projeção da estrutura molecular do complexo C5AS. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.



A Figura 27 mostra a projeção da cela unitária do complexo **C5AS** e os operadores de simetria pelo pictograma da *International Tables for Crystallography* onde observa-se o eixo de rotação-translação de ordem  $2_1$ .

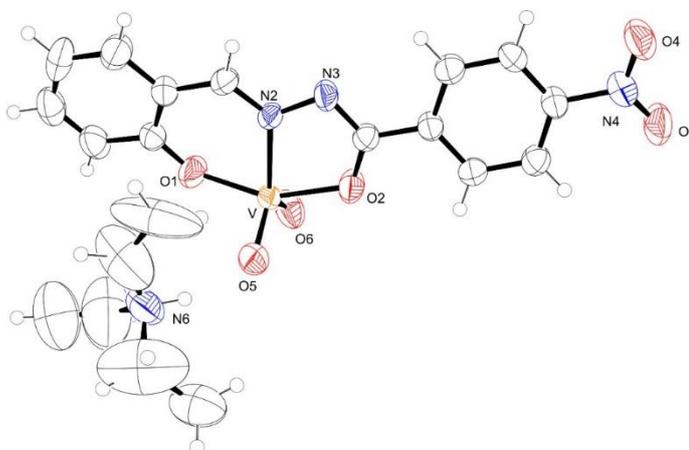
Figura 27 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C5AS (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita).



### 5.2.3.2. Grupo espacial $C1c1$

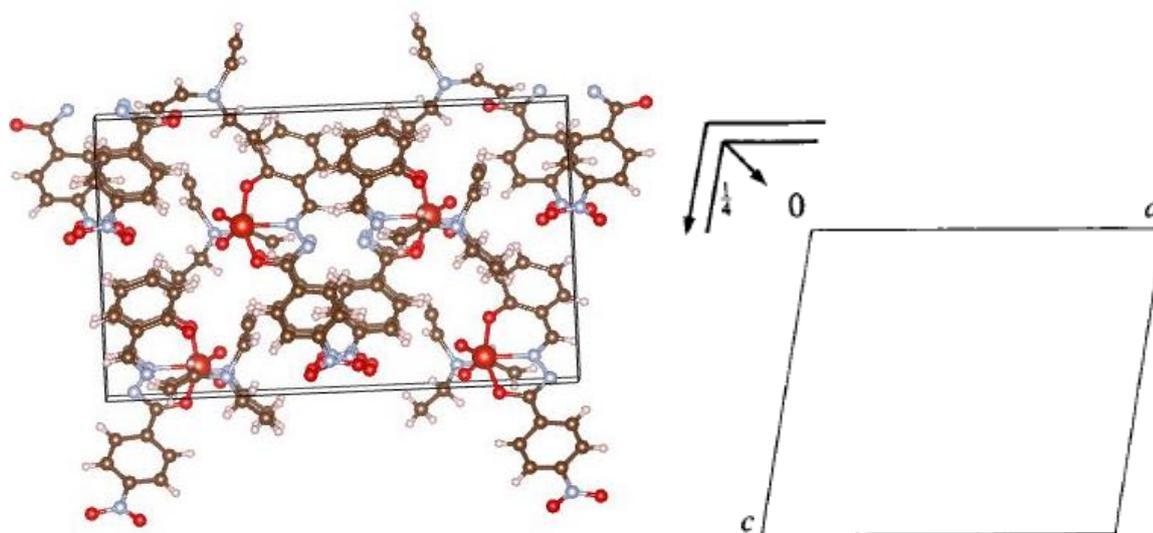
O complexo C4AS cristalizou no grupo espacial  $C1c1$ , ainda no sistema monoclinico, (nº 9 da *International Tables of Crystallography*) e foi obtido através da complexação do ligante L4AS (Figura 28).

Figura 28 - Projeção da estrutura molecular do complexo C4AS. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%



Na Figura 29 apresenta-se a representação da cela unitária do complexo C4AS e o pictograma do grupo espacial e as características do grupo em questão, onde temos o plano de simetria de  $1/4$  ao longo de duas bordas da célula. paralelo à página. A tradução é meio ao longo de  $a$  e meio ao longo de  $b$ .

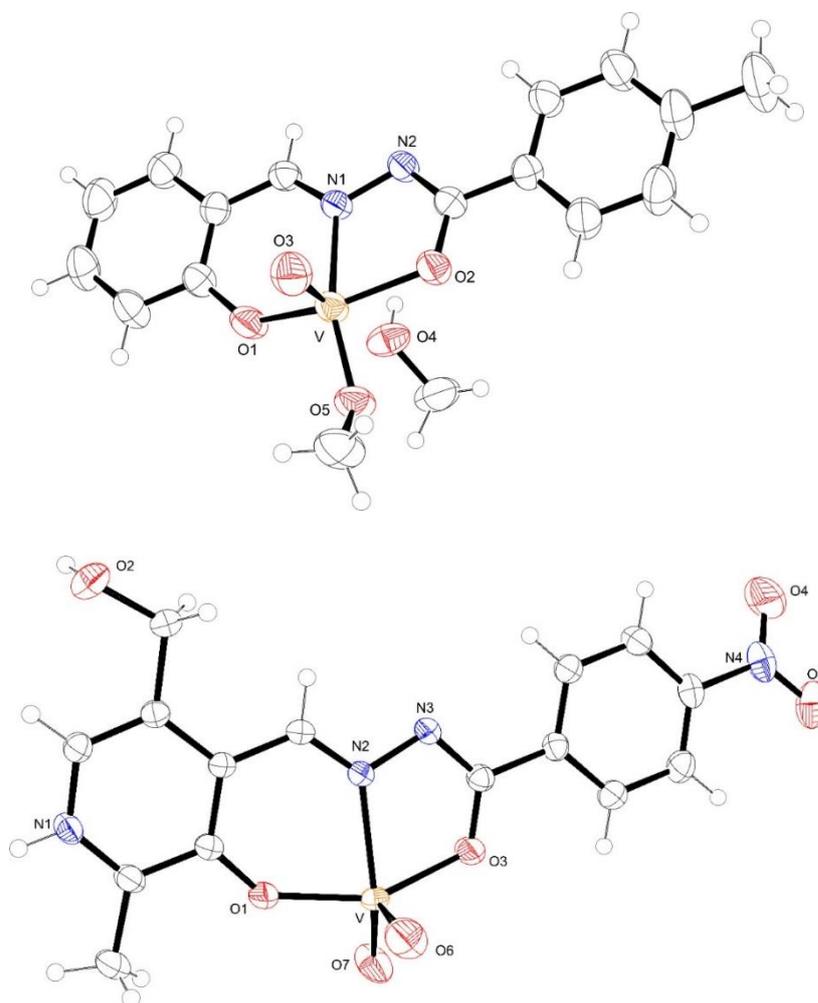
Figura 29 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C4AS (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita).



### 5.2.3.3. Grupo espacial $P2_1/n$

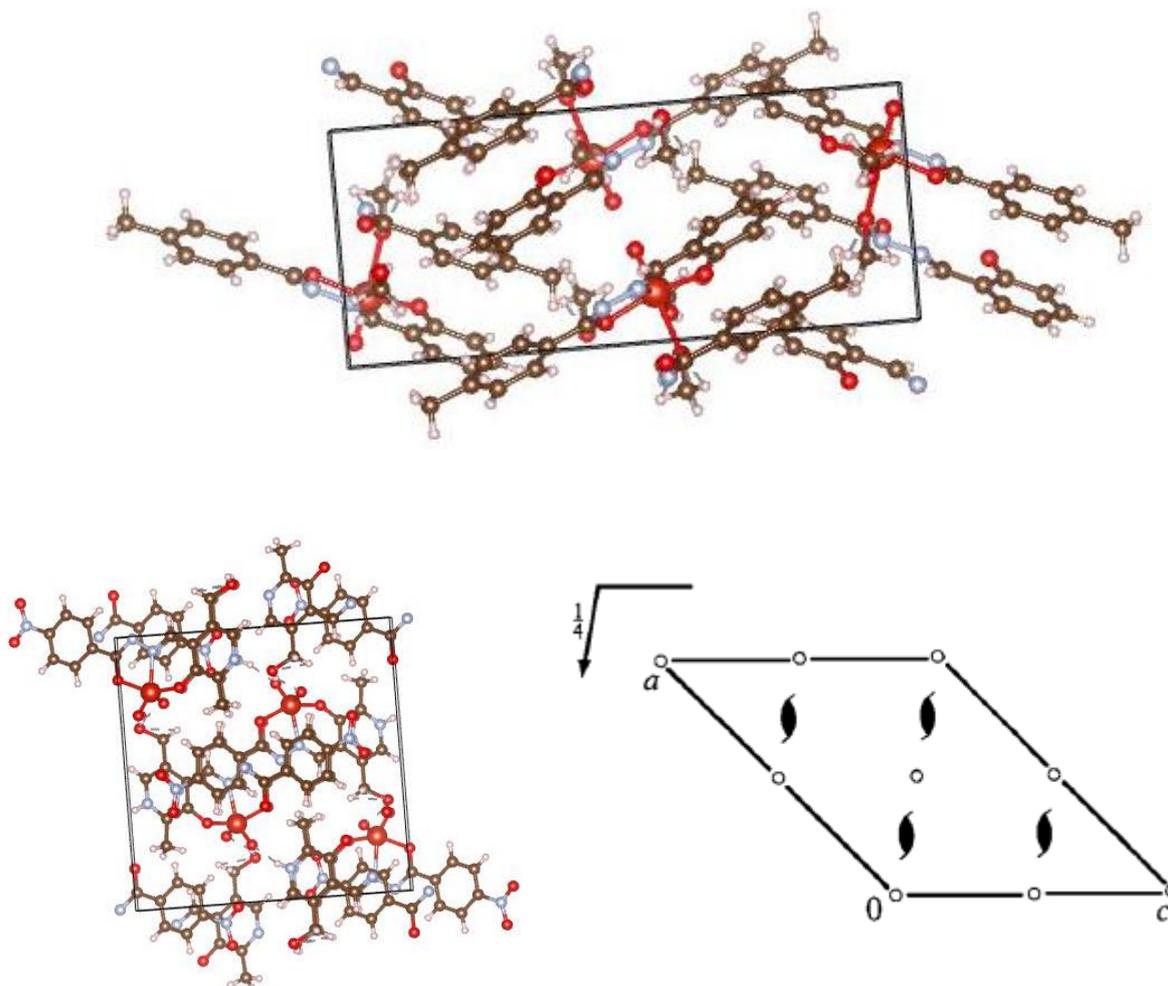
Os complexos C2AS e C4P obtidos a partir dos ligantes L2AS e L4P respectivamente, cristalizaram no sistema monoclinico e grupo espacial  $P2_1/n$  (n° 14 da *International Tables of Crystallography*) (Figura 30).

Figura 30 - Projeção da estrutura molecular do complexo C2AS (acima) e C4P (abaixo).  
Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.



A Figura 31 e o pictograma abaixo exemplificam o eixo em parafuso  $2_1$  e um centro de inversão. O grupo espacial foi definido pela ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral ( $hkl$ ) indicam um tipo de Bravais  $P$  para a cela unitária, enquanto as condições de reflexão zonais ( $h0l$ ,  $0kl$ ,  $hk0$ ) e seriais ( $0k0$ ,  $h00$ ,  $00l$ ) vinculam-se aos elementos de simetria  $c$ ,  $n$  e  $2_1$ .

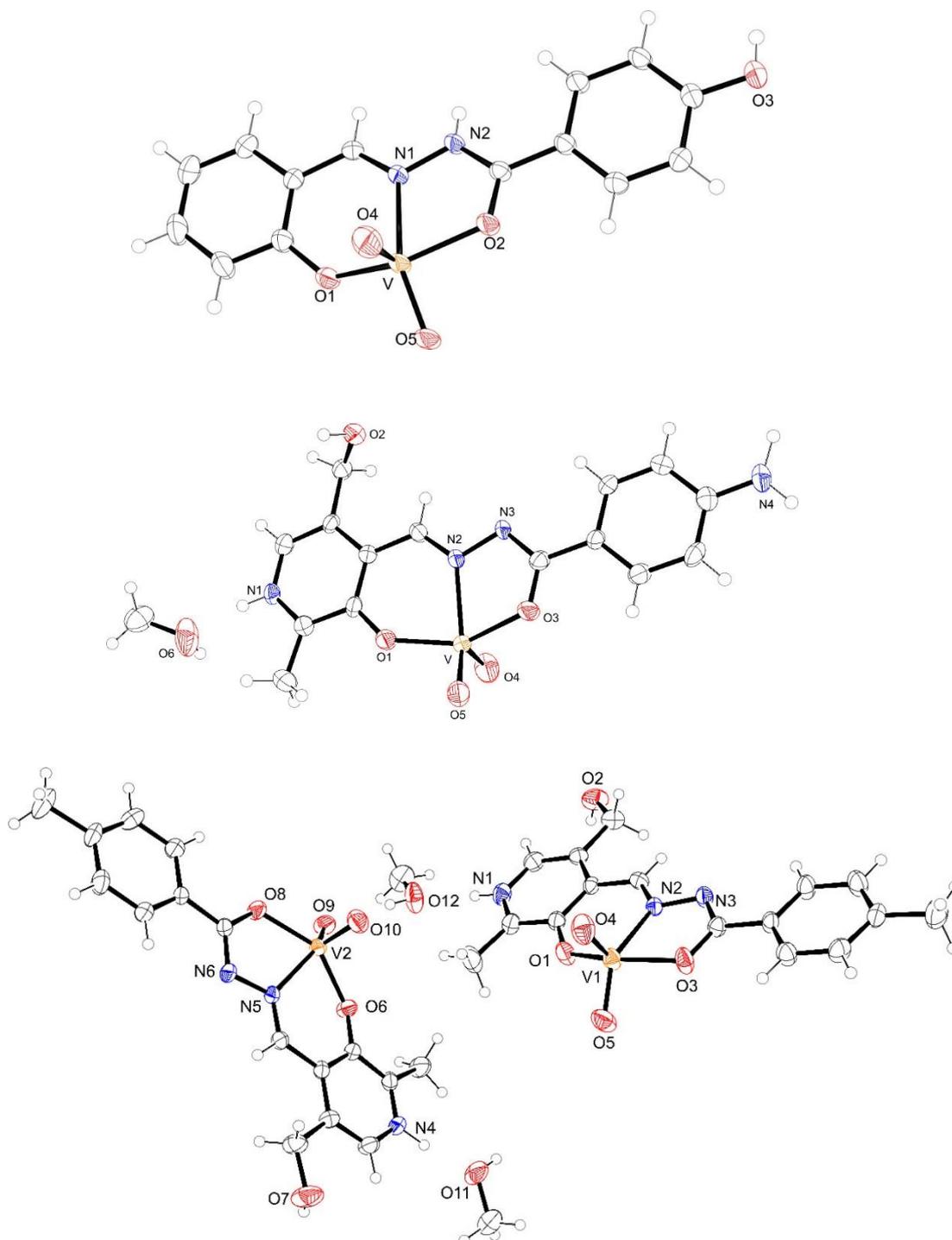
Figura 31 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C2AS (acima), C4P (abaixo esquerda), pictograma de operadores de simetria (abaixo direita).



#### 5.2.3.4. Grupo espacial $P2_1/c$

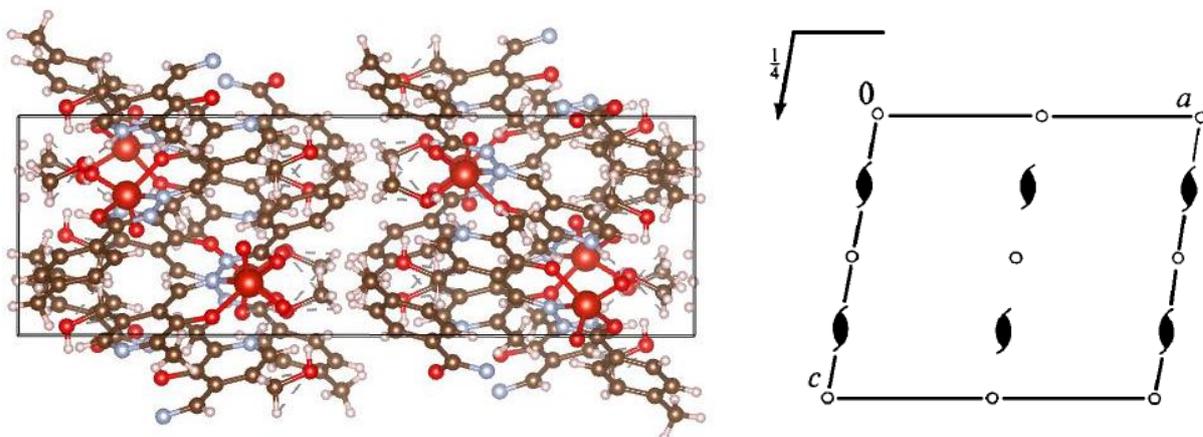
O grupo espacial  $P2_1/c$  (n° 14 da *International Tables of Crystallography*) é centrossimétrico e apresenta simetria de Laue  $2/m$ . A ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral  $(hkl)$  foi determinante para um tipo de Bravais  $P$  para a cela unitária. As condições das reflexões zonais  $(h0l, 0kl, hk0)$  e seriais  $(0k0, h00, 00l)$  estão vinculadas aos operadores de simetria  $c$  e  $2_1$  e pelos resultados obtidos pela difração de raio X mostrou que os complexos C1AS, C2P e C5P cristalizaram nesse grupo espacial Figura 32.

Figura 32 - Projeção da estrutura molecular dos complexos C1AS, C5P e C2P respectivamente. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.



O C2P foi escolhido para exemplificar a simetria do grupo através do pictograma e da representação da cela unitária (Figura 33).

Figura 33 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C2P (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita).

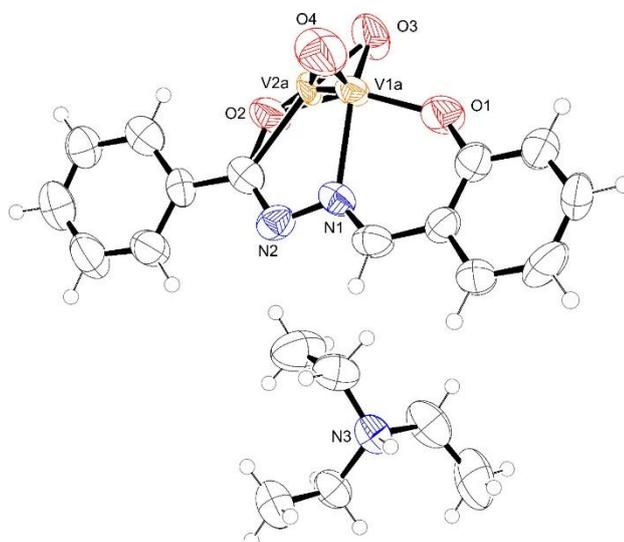


## 5.2.4. SISTEMA CRISTALINO ORTORRÔMBICO

### 5.2.4.1. Grupo espacial *Pbca*

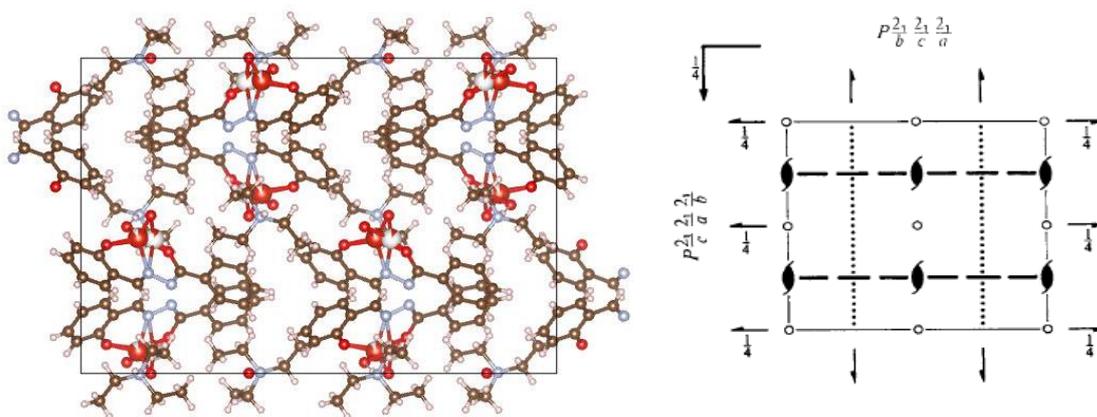
A análise de raios X em monocristal mostrou que o complexo **C3AS** cristaliza no sistema ortorrômbico, grupo espacial *Pbca* (n° 61 da *International Tables of Crystallography*) (Figura 34).

Figura 34 - Projeção da estrutura molecular do complexo C3AS. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%



A ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral ( $hkl$ ) foi determinante para um tipo de Bravais  $P$  para a cela unitária. As condições das reflexões zonais ( $h0l$ ,  $0kl$ ,  $hk0$ ) e seriais ( $0k0$ ,  $h00$ ,  $00l$ ) estão vinculadas aos operadores de simetria  $2_1$  e  $a, b, c$ . O grupo espacial  $Pbca$  é centrossimétrico e apresenta simetria de Laue  $mmm$ . A Figura 35 representa a projeção do conteúdo da cela do complexo C3AS e o pictograma do grupo espacial  $Pbca$  retirado da *International Tables for Crystallography*.

Figura 35 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C3AS (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita).



#### 5.2.4.2. Grupo espacial $P2_12_12_1$

O complexo **C3P** (Figura 36) cristalizou no sistema ortorrômbico, grupo espacial  $P2_12_12_1$ , N° 19 da *International Tables of Crystallography* e foi definido pela ausência de extinções sistemáticas nas reflexões da classe integral ( $hkl$ ) indicam um tipo de Bravais  $P$  para a cela unitária, enquanto as condições de reflexão seriais ( $0k0$ ,  $h00$ ,  $00l$ ) vinculam-se aos elementos de simetria  $2_1$  (Figura 37). Este grupo espacial centrossimétrico, com simetria de Laue  $mmm$ , as condições

Figura 36 - Projeção da estrutura molecular do complexo C3P. Elipsóides térmicos com nível de probabilidade de 50%.

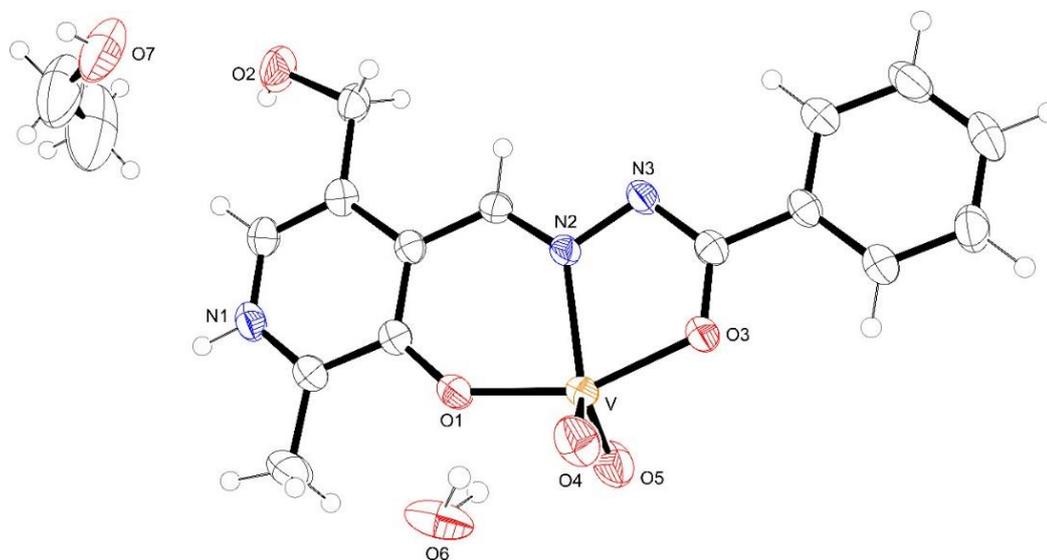
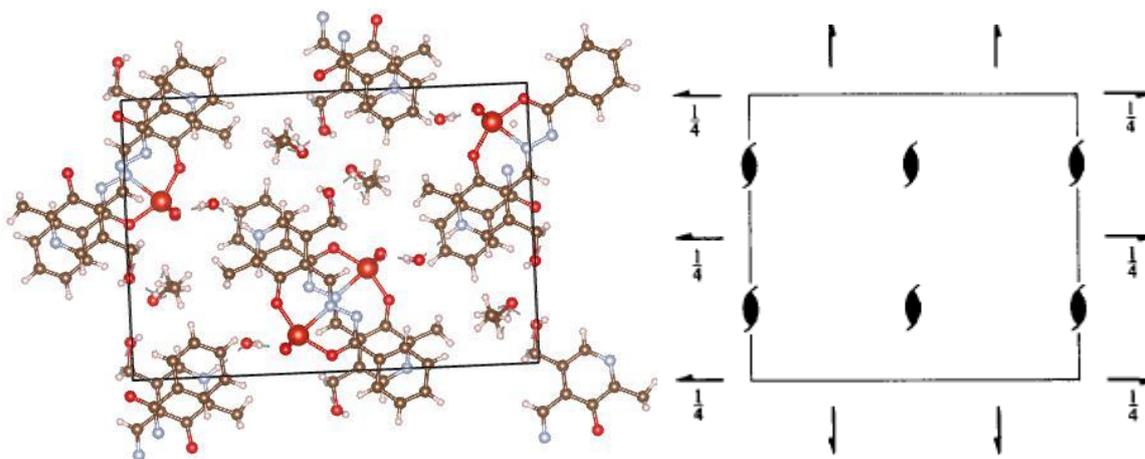


Figura 37 - Representação do empacotamento cristalino na cela unitária do complexo C3P (esquerda), pictograma de operadores de simetria (direita).



### 5.3. PARTE 3: POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA TIROSINASE

Os potenciais inibitórios da enzima foram calculados pela porcentagem (Equação 1) de inibição na formação de dopacromo a partir da L-tirosina.

Equação 1 - Equação utilizada para determinação dos potenciais de inibição.

$$\%I = (C_1 - C_B) / C_B \times 100\%$$

Onde,  $C_B$  é a concentração da tirosinase com DMSO e  $C_1$  é a concentração dos respectivos complexos. As porcentagens de inibição estão representadas na Tabela 9.

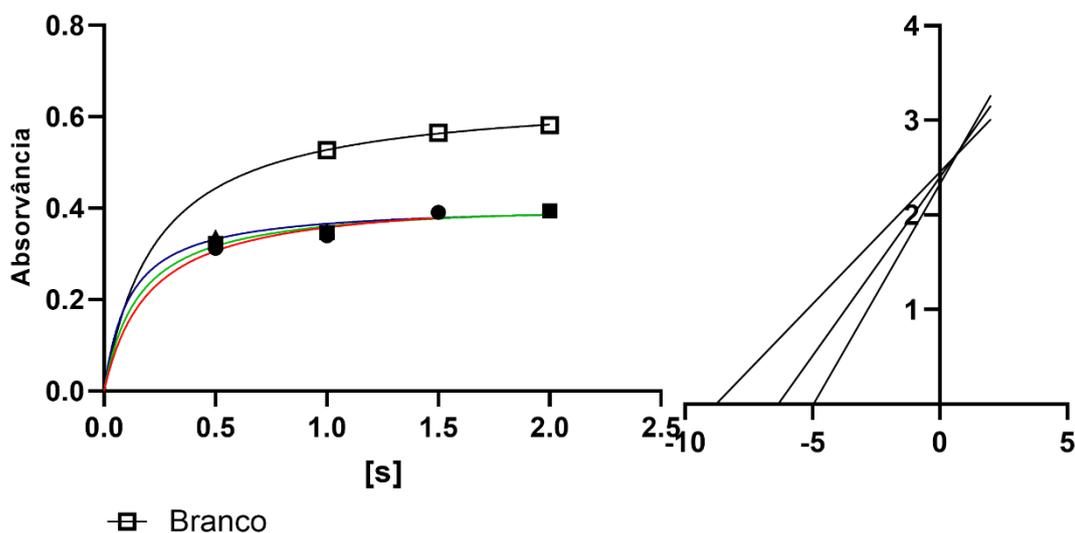
Tabela 9 - Porcentagem de inibição dos complexos e ligantes sintetizados e do ácido kojico utilizado como padrão de comparação.

Composto	% inibição 0,1 nM	Composto	% inibição 0,1 nM
C1AS	33	L1AS OH	*
C2AS	18	L2AS ME	*
C3AS	20	L3AS NH <sub>2</sub>	2,5
C4AS	8	L4AS NO <sub>2</sub>	*
C5AS	*	L5AS H	14
C1P	*	L1P OH	17
C2P	15	L2P ME	13
C3P	*	L3P NH <sub>2</sub>	11
C4P	5	L4P NO <sub>2</sub>	16
C5P	*	L5P H	9
		Ácido Kojico	65

O ácido kójico é um conhecido inibidor da tirosinase por isso foi empregado como um inibidor padrão da enzima. A cinética da tirosinase na ausência de inibidor mostrou comportamento típico de enzima michaeliana, já a cinética para o ácido kójico mostrou que este foi capaz de promover inibição significativa na atividade da tirosinase, podendo ser confirmado pelo gráfico de Linewaver-Burk (Figura 38).

Porém de modo geral, nenhum complexo apresentou elevado índice de inibição da enzima conforme pode ser visto na tabela 9, sendo que até mesmo os complexos C5AS, C1P, C3P e C5P não apresentaram atividade.

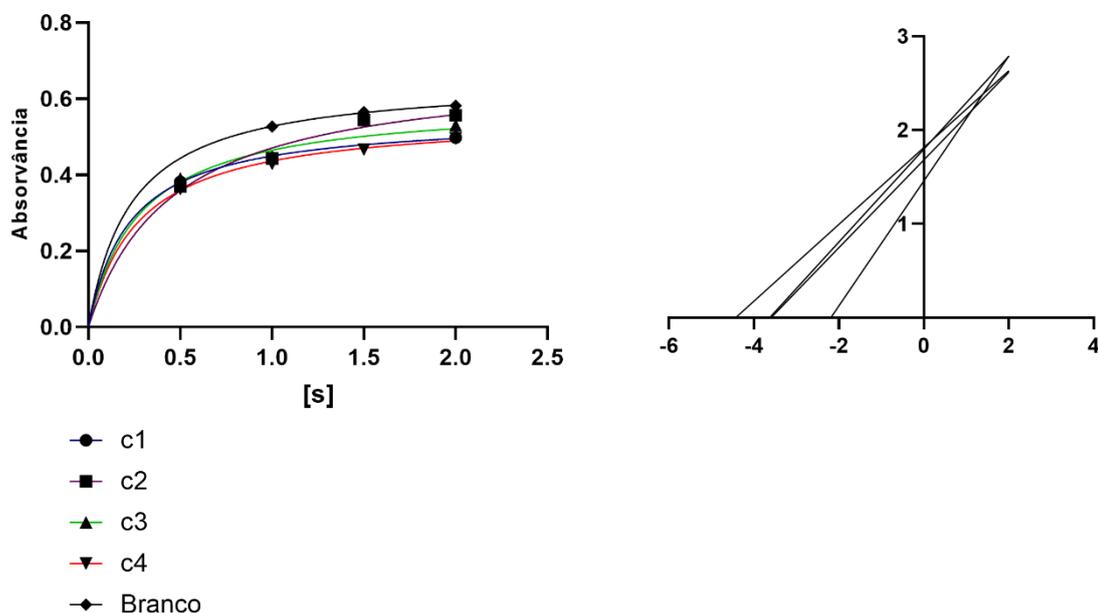
Figura 38 - Cinética do ácido Kojico e a linearização do gráfico mostrando um perfil de inibição competitiva.



De modo atípico os ligantes contendo a condensação com piridoxal apresentam atividade modesta a inibição da enzima, porém sendo diferenciados dos complexos como mostrado na tabela 7, relevando que o centro metálico nestes casos, teve um papel negativo para inibição na enzima, ou seja, os ligantes competem pelo sitio ativo da enzima e dessa forma conseguiram inibi-la, no entanto quando temos a formação do complexo, estes deixam de apresentar caráter inibitório, pois não competem mais com o substrato (MONZANI et al., 1998).

De modo mais abrangente quando comparamos os ligantes que apresentam atividade e os complexos, independentemente daqueles contendo aldeído salicílico ou piridoxal não existe uma variação significativa, porém o único complexo que apresentou uma melhor atividade foi o C1AS e por isso foi escolhido para a realização da cinética e padrão de inibição. O perfil do gráfico nos mostra que o ácido kójico possui uma inibição competitiva pelo sitio ativo da enzima da mesma maneira que o complexo C1AS (Figura 39) (BHATTACHARYYA e TRACEY, 2001).

Figura 39 - Cinética do complexo C1AS e a linearização do gráfico mostrando um perfil de inibição competitiva.



Dada a semelhança química com a estrutura do substrato tirosina, grande parte dos polifenóis promovem uma inibição do tipo competitivo, concorrendo pelo centro ativo da enzima. De acordo com Chang (CHANG, 2009) o C1AS apresenta atividade competitiva devido a presença do grupo OH fenolato da benzohidrazida, além disso o efeito estérico, seu pequeno tamanho, auxilia nesse tipo de competição. Enquanto que derivados de piridina restringiam competitivamente a enzima tirosinase os ligantes de piridoxal, por conter essa função, apresentaram um efeito inibitório maior, no entanto ao se ter o íon vanádio presente seu tamanho aumenta consideravelmente prejudicando a interação complexo-sítio ativo.

## 6. CONCLUSÕES

Os ligantes derivados de hidrazidas benzoicas utilizados nesse trabalho já foram descritos e amplamente difundidos pela literatura e foram possíveis de serem sintetizados partindo de metodologias já publicadas. Desses ligantes, contendo dois aldeídos diferentes (aldeído salicílico e cloridrato de piridoxal), obtiveram-se dez complexos inéditos com centros metálicos de vanádio. As caracterizações de tais complexos, apesar da falta de uma metodologia mais rigorosa como um controle de temperatura para UV-Vis e espectroscopia RAMAN para uma melhor discussão na espectroscopia no infravermelho..., foi realizada por difração de raios X em monocristal, IV, UV-Vis e VC. As diferenças observadas nas duas classes de complexos de vanádio mostraram seguir um padrão, uma vez que compostos

contendo aldeído salicílico mostraram-se propensos a estarem na forma iônica, já os complexos de piridoxal seguiram uma tendência a permanecerem neutros.

A ação inibitória da enzima tirosinase foi determinada e comparada com a inibição do ácido kójico e através da cinética enzimática foi possível determinar o tipo de inibição do complexo CIAS. Apesar do grande número de compostos testados (dez ligantes e dez complexos) a atividade biológica testada não se mostrou promissora.

Em suma, foi possível sintetizar ligantes derivados de hidrazidas benzoicas com cinco substituintes diferentes e dois diferentes aldeídos. A partir dos ligantes sintetizados obtiveram-se dez novos complexos que foram caracterizados por difração de raios X em monocristal, IV, UV-Vis e VC. A ação inibitória da enzima tirosinase foi determinada e comparada com a inibição do ácido kójico e foi possível determinar o tipo de inibição do complexo CIAS através da cinética enzimática.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-AAL, M. T. et al. Synthesis and antiviral evaluation of some sugar arylglycinoylhydrazones and their oxadiazoline derivatives. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 339, n. 12, p. 656-63, Dec 2006.

ACQUAYE, J. H. K. A.; RICHARDSON, M. F. Palladium and platinum complexes with vitamin B6 compounds. **Inorganica Chimica Acta**, v. 201, n. 1, p. 101-107, 1992/11/01/ 1992.

ANICETO, C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol (acetaminophen) in pharmaceutical formulations. **Química Nova**, v. 25, p. 387-391, 05/01 2002.

BHAT, K. et al. Synthesis and characterization of various Schiff bases for non-linear optical applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 1996/06/01/ 1996.

BHATIA, S. et al. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology (Williston Park)**, v. 23, n. 6, p. 488-96, May 2009.

BHATTACHARYYA, S.; TRACEY, A. S. Vanadium(V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. **J Inorg Biochem**, v. 85, n. 1, p. 9-13, May 2001.

CABANES, J. et al. Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates--reply. **J Theor Biol**, v. 214, n. 2, p. 321-8, Jan 21 2002.

CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 6, p. 2440-75, May 26 2009.

CHEN, Q. X. et al. Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution. **Biochemistry (Mosc)**, v. 68, n. 6, p. 644-9, Jun 2003.

CLAUS, H.; DECKER, H. Bacterial tyrosinases. **Syst Appl Microbiol**, v. 29, n. 1, p. 3-14, Jan 2006.

COCCO, M. T. et al. Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazinopyrimidine-5-carbonitrile derivatives. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 2, p. 366-72, Jan 15 2006.

CORNISH-BOWDEN, A. One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. **Perspectives in Science**, v. 4, p. 3-9, 2015/03/01/ 2015.

DANKHOFF, K. et al. Anticancer properties of a new non-oxido vanadium(IV) complex with a catechol-modified 3,3'-diindolylmethane ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 194, p. 1-6, 2019/05/01/ 2019.

DERI, B. et al. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34993, 2016.

GAMBINO, D. Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 19, p. 2193-2203, 2011/10/01/ 2011.

GRANT, G. A. The many faces of partial inhibition: Revealing imposters with graphical analysis. **Arch Biochem Biophys**, v. 653, p. 10-23, Sep 1 2018.

GÜRSOY, A.; KARALI, N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of 3-[[3-phenyl-4(3H)-quinazolinone-2-yl]mercaptoacetyl]hydrazono]-1H-2-indolinones. **Eur J Med Chem**, v. 38, n. 6, p. 633-43, Jun 2003.

GÜRSOY, E.; GÜZELDEMIRCI, N. U. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-b]thiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 3, p. 320-326, 2007/03// 2007.

HALAOULI, S. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 219-232, 2006.

IMRAMOVSKÝ, A. et al. A new modification of anti-tubercular active molecules. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 7, p. 2551-9, Apr 1 2007.

JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, p. 305-13, 09/01 2004.

JAKUSCH, T. et al. Complexes of pyridoxal thiosemicarbazones formed with vanadium(IV/V) and copper(II): Solution equilibrium and structure. **Inorganica Chimica Acta**, v. 472, p. 243-253, 2018/03/01/ 2018.

JEON, H. J. et al. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 26, p. 9827-33, Dec 27 2006.

KUBO, I. et al. Tyrosinase inhibition kinetics of anisic acid. **Z Naturforsch C J Biosci**, v. 58, n. 9-10, p. 713-8, Sep-Oct 2003.

KUBO, I. et al. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. **Bioorg Med Chem**, v. 8, n. 7, p. 1749-55, Jul 2000.

LEU, Y.-L. et al. Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal use. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 552-556, 2008.

MARTINEZ-BULIT, P. et al. 2,6-Bis(2,6-diethylphenyliminomethyl)pyridine coordination compounds with cobalt(II), nickel(II), copper(II), and zinc(II): synthesis, spectroscopic characterization, X-ray study and in vitro cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 142, p. 1-7, 2015/01/01/ 2015.

MAURYA, M. R. et al. Vanadium complexes having [V(IV)O](2+) and [V(V)O(2)](+) cores with binucleating dibasic tetradentate ligands: Synthesis, characterization, catalytic and antiamoebic activities. **Dalton Trans**, v. 39, n. 5, p. 1345-60, Feb 7 2010.

METZLER, D. E. et al. A General Mechanism for Vitamin B6-catalyzed Reactions1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 3, p. 648-652, 1954/02/01 1954.

MONZANI, E. et al. Tyrosinase Models. Synthesis, Structure, Catechol Oxidase Activity, and Phenol Monooxygenase Activity of a Dinuclear Copper Complex Derived from a Triamino Pentabenzimidazole Ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 553-562, 1998/02/01 1998.

MURAŠKOVÁ, V. et al. Iron(III) and cobalt(III) complexes with pentadentate pyridoxal Schiff base ligand – structure, spectral, electrochemical, magnetic properties and DFT calculations. **Polyhedron**, v. 197, p. 115019, 2021/03/15/ 2021.

NERYA, O. et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1389-95, May 2004.

PEARLSTEIN, R. A. et al. Building New Bridges between In Vitro and In Vivo in Early Drug Discovery: Where Molecular Modeling Meets Systems Biology. **Curr Top Med Chem**, v. 17, n. 23, p. 2642-2662, 2017.

PESSOA, J. C. et al. Vanadium compounds in medicine. **Coord Chem Rev**, v. 301, p. 24-48, Oct 15 2015.

PIAO, L. Z. et al. Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 50, n. 3, p. 309-11, Mar 2002.

POLADIAN, Q. et al. A new zinc(II) complex with N2O2-tetradentate schiff-base derived from pyridoxal-S-methylthiosemicarbazone: Synthesis, characterization, crystal structure, DFT, molecular docking and antioxidant activity studies. **Polyhedron**, v. 201, p. 115164, 2021/06/01/ 2021.

QIU, L. et al. Irreversibly inhibitory kinetics of 3,5-dihydroxyphenyl decanoate on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 22, p. 6206-11, Nov 15 2005.

REHDER, D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 14, p. 1823-1827, 2012.

\_\_\_\_\_. Vanadium. Its role for humans. **Met Ions Life Sci**, v. 13, p. 139-69, 2013.

ROBIN, A. Y.; FROMM, K. M. Coordination polymer networks with O- and N-donors: What they are, why and how they are made. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, n. 15, p. 2127-2157, 2006/08/01/ 2006.

ROLLAS, S.; KUCUKGUZEL, S. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910-39, Aug 17 2007.

ROSU, T. et al. Synthesis, structural and spectral studies of Cu(II) and V(IV) complexes of a novel Schiff base derived from pyridoxal. Antimicrobial activity. **Polyhedron**, v. 31, n. 1, p. 352-360, 2012/01/04/ 2012.

SABUDAK, T. et al. Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. **Nat Prod Res**, v. 20, n. 7, p. 665-70, Jun 2006.

SAGHAIE, L. et al. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. **Res Pharm Sci**, v. 8, n. 4, p. 233-42, Oct 2013.

SAH, P. P.; PEOPLES, S. A. Isonicotinyl hydrazones as antitubercular agents and derivatives for identification of aldehydes and ketones. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 43, n. 9, p. 513-24, Sep 1954.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? **Exp Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 139-40; discussion 141-60, Feb 2008.

SENDOVSKI, M. et al. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. **J Mol Biol**, v. 405, n. 1, p. 227-37, Jan 7 2011.

SHARIF, S. et al. Coupling of functional hydrogen bonds in pyridoxal-5'-phosphate-enzyme model systems observed by solid-state NMR spectroscopy. **J Am Chem Soc**, v. 129, n. 14, p. 4440-55, Apr 11 2007.

SHIGETA, S. et al. Broad spectrum anti-RNA virus activities of titanium and vanadium substituted polyoxotungstates. **Antiviral Res**, v. 58, n. 3, p. 265-71, May 2003.

SIQUEIRA, J. D. et al. SOD activity of new copper II complexes with ligands derived from pyridoxal and toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 204, p. 110950, 2020/03/01/ 2020.

SZKLARZEWICZ, J. et al. Ligand role on insulin-mimetic properties of vanadium complexes. Structural and biological studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 516, p. 120135, 2021/02/01/ 2021.

TODESCHINI, A. R. et al. Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 189-199, 1998/03/01/ 1998.

VIDEIRA, I. F. et al. Mechanisms regulating melanogenesis. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 1, p. 76-83, Jan-Feb 2013.

WANG, L. et al. A Genome-Wide High-Resolution Array-CGH Analysis of Cutaneous Melanoma and Comparison of Array-CGH to FISH in Diagnostic Evaluation. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 5, p. 581-591, 2013.

WILLSKY, G. R. et al. Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Coord Chem Rev**, v. 255, n. 19-20, p. 2258-2269, Oct 2011.

WONG, S. Y. et al. Physiologically stable vanadium(IV) porphyrins as a new class of anti-HIV agents. **Chem Commun (Camb)**, n. 28, p. 3544-6, Jul 28 2005.

ZAIDI, K. U. et al. Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. **Biochem Res Int**, v. 2014, p. 854687, 2014.

## ANEXO 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS COMPLEXOS.

**Complexo C1AS:** Rendimento cristalino: 34%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 326.2 nm;  $\epsilon$ : 11104 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $8.61 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 106 °C. FT-IR: 3097 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1601 [l,  $\delta$ (C-N)imine]; 920 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym]; 861 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C2AS:** Rendimento cristalino: 9%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 325.2 nm;  $\epsilon$ : 12628 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $6.29 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: >300 °C (decomp.). FT-IR: 1611 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 906 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym]; 880 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C3AS:** Rendimento cristalino: 22%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 325 nm;  $\epsilon$ : 16103 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $6.02 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 117 °C. FT-IR: 1606 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 945 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym]; 882 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C4AS:** Rendimento cristalino: 12%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 425.8 nm;  $\epsilon$ : 17699 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $4.08 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 150 °C (decomp.). FT-IR: 1612 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 892 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym]; 851 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C5AS:** Rendimento cristalino: 23%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 410 nm;  $\epsilon$ : 11967 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $6.61 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 175 °C (decomp.). FT-IR: 3381 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1603 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 908 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym].

**Complexo C1P:** Rendimento cristalino: 29%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 423 nm;  $\epsilon$ : 21122 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $6.61 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 155 °C (decomp.). FT-IR: 3423 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1645 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 857 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C2P:** Rendimento cristalino: 6%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 339.8 nm;  $\epsilon$ : 9486 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $4.08 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 108 °C. FT-IR: 3394 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1645 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 967 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym].

**Complexo C3P:** Rendimento cristalino: 19%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 418.4 nm;  $\epsilon$ : 24886 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $4.08 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 217 °C (decomp.). FT-IR: 3364 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1596 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 935 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym]; 907 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C4P:** Rendimento cristalino: 12%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 352 nm;  $\epsilon$ : 213.6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $4.08 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 215 °C (decomp.). FT-IR: 3045 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1586 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 955 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym]; 900 [s,  $\nu$ (O=V=O)asym].

**Complexo C5P:** Rendimento cristalino: 9%. UV-Vis  $\lambda_{\text{max.}}$ : 353 nm;  $\epsilon$ : 235.6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (DMSO; [C1] =  $4.08 \times 10^{-5}$  M). Ponto de fusão: 180 °C (decomp.). FT-IR: 3134 [m,  $\nu$  (O-H)]; 1541 [s,  $\delta$ (C-N)imine]; 915 [s,  $\nu$ (O=V=O)sym].

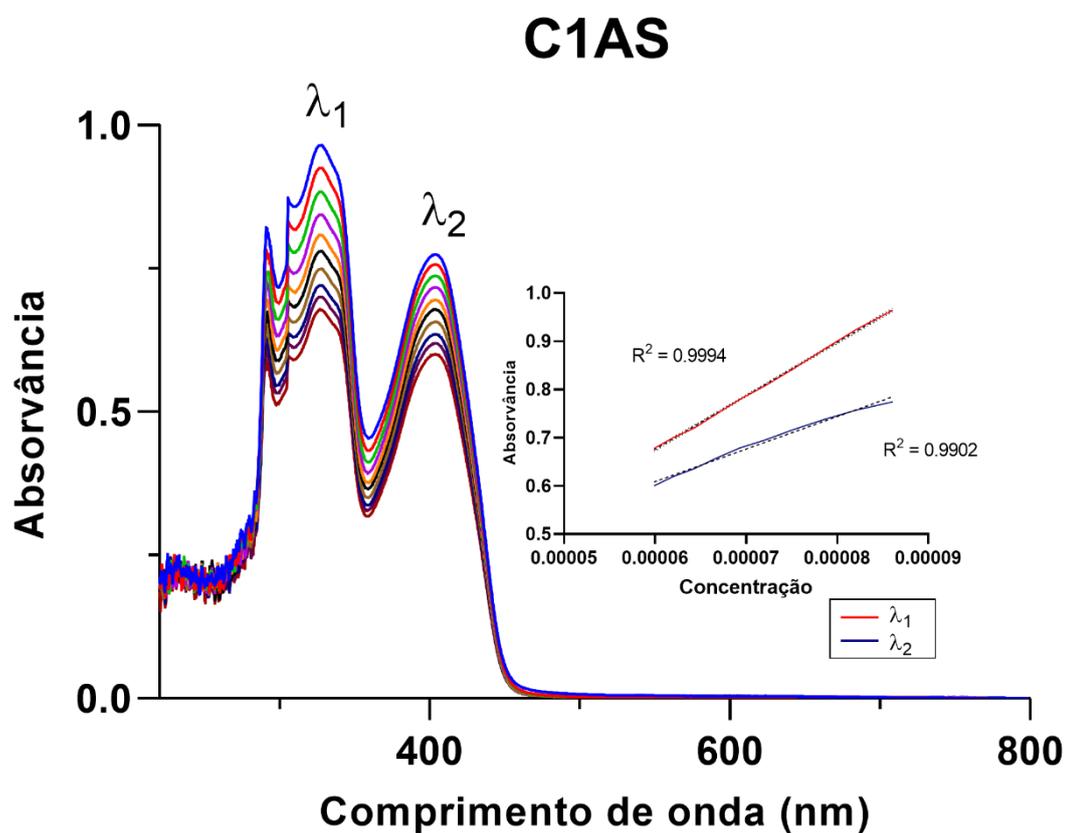
## ANEXO 2 - PARÂMETROS CRISTALOGRAFICOS DOS COMPLEXOS SINTETIZADOS

Parâmetros / Complexo	C1AS	C2AS	C3AS
Fórmula Empírica	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> V	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> V	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> V
M M (g.mol <sup>-1</sup> )	338.19	382.28	423.38
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Radiação, λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino / Grupo espacial	Monoclinic, <i>P21/c</i>	Monoclinic, <i>P21/n</i>	Orthorhombic, <i>Pbca</i>
<i>a</i> (Å)	6.8682(11)	11.9829(7)	24.7205(14)
<i>b</i> (Å)	13.342(2)	7.8344(4)	16.5185(8)
<i>c</i> (Å)	14.758(2)	18.9453(11)	10.1658(6)
$\alpha$ (°)	90	90	90
$\beta$ (°)	90.811(5)	98.228(2)	90
$\gamma$ (°)	90	90	90
Volume (Å <sup>3</sup> )	1352.2(4)	1760.25(17)	4151.2(4)
<i>Z</i> / $\rho_{calc}$ . (mg.m <sup>-3</sup> )	4 ; 1.661	4, 1.443	8, 1.355
Coef. de absorção linear (nm <sup>-1</sup> )	0.760	0.593	0.508
<i>F</i> (000)	688	792	1776
Tamanho do cristal (mm)	0.22 x 0.14 x 0.10	0.30 x 0.19 x 0.11	0.215 x 0.202 x 0.195
Região de varredura angular $\theta$ (°)	2.76 to 29.64	2.16 to 29.19	2.06 to 28.37
Região de varredura dos índices	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 9, -18 ≤ <i>k</i> ≤ 18, -20 ≤ <i>l</i> ≤ 20	-16 ≤ <i>h</i> ≤ 16, -10 ≤ <i>k</i> ≤ 10, -25 ≤ <i>l</i> ≤ 25	-32 ≤ <i>h</i> ≤ 16, -20 ≤ <i>k</i> ≤ 20, -13 ≤ <i>l</i> ≤ 13
Nº de reflexões coletadas/independentes	83169 / 3824	198246 / 4760	56237 / 5182
Integralidade da medida	99.7%	99.8%	99.7%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
<i>T</i> <sub>min</sub> / <i>T</i> <sub>máx</sub>	0.9379 / 0.8706		0.7457 / 0.5978
Dados/restrições/parâmetros	3824 / 0 / 199	4760 / 0 / 226	5182 / 0 / 263
Goodness-of-fit em <i>F</i> <sup>2</sup>	0.872	1.010	1.046
Índice <i>R</i> <sub>int</sub>	0.0384	0.0569	0.1026
<i>R</i> <sub>1</sub> [ <i>I</i> >2σ( <i>I</i> )] e <i>wR</i> <sub>2</sub> [ <i>I</i> >2σ( <i>I</i> )]	0.0345/ 0.0997	0.0406/0.1153	0.0994/ 0.1881
<i>R</i> <sub>1</sub> e <i>wR</i> <sub>2</sub> (todos os dados)*	0.0423 /0.1060	0.0554/ 0.1244	0.1083/ 0.1285
$\rho_{max}$ (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> )/ $\rho_{min}$ (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> )	0.505 and -0.444 e·Å <sup>-3</sup>	0.349 and -0.296 e·Å <sup>-3</sup>	0.743 and - 0.293e·Å <sup>-3</sup>

Parâmetros / Complexo	C4AS	C5AS	C1P
Fórmula Empírica	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> V	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> V	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
M M (g.mol <sup>-1</sup> )	463.34	4638.40	465.74
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	100(2)
Radiação, λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino / Grupo espacial	Monoclinic, C1c1	Monoclinic, P21	Triclinic, P1
a (Å)	12.5296(10)	7.4208(3)	5.2976(2)
b (Å)	20.2016(10)	8.7002(3)	9.7839(4)
c (Å)	8.7847(4)	17.1528(7)	10.0899(5)
α (°)	90	90	103.0870(10)
β (°)	102.473(2)	95.8700(10)	96.0160(10)
γ (°)	90	90	100.2540(10)
Volume (Å <sup>3</sup> )	2171.1(2)	1101.62(7)	495.47(4)
Z / ρ <sub>calc.</sub> (mg.m <sup>-3</sup> )	4, 1.418	2, 1.322	2 ; 1.555
Coef. de absorção linear (nm <sup>-1</sup> )	0.500	0.482	1.138
F (000)	956	460	239
Tamanho do cristal (mm)	0.50 x 0.45 x 0.08	0.27 x 0.10 x 0.09	0.28 x 0.12 x 0.05
Região de varredura angular θ (°)	1.95 to 30.02	2.76 to 27.42	4.10 to 30.48
Região de varredura dos índices	-17 ≤ h ≤ 17, -28 ≤ k ≤ 28, -12 ≤ l ≤ 9	-9 ≤ h ≤ 9, -10 ≤ k ≤ 11, -22 ≤ l ≤ 22	-7 ≤ h ≤ 7, -13 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 14
Nº de reflexões coletadas/ independentes	21776 / 5222	23710 / 4762	13645 / 2999
Integralidade da medida	99.8%	99.7%	99.6%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
T <sub>min</sub> / T <sub>máx</sub>	0.9711 / 0.79880	0.8184/0.6294	0.94530.7412
Dados/restrições/parâmetros	5222 / 2 / 281	4762 / 1 / 265	2999 / 0 / 142
Goodness-of-fit em F <sup>2</sup>	1.086	1.073	1.071
Índice R <sub>int</sub>	0.0690	0.0336	0.0191
R <sub>1</sub> [I>2σ(I)] e wR <sub>2</sub> [I>2σ(I)]	0.0643/ 0.1634	0.0309/0.0736	0.0191/0.0224
R <sub>1</sub> e wR <sub>2</sub> (todos os dados)*	0.0866 /0.1772	0.0373/0.0765	0.0236 /0.0606
ρ <sub>max</sub> (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> ) / ρ <sub>min</sub> (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> )	0.509 and -0.493 e·Å <sup>-3</sup>	0.259 and -0.193 e·Å <sup>-3</sup>	0.453 and -0.353 e·Å <sup>-3</sup>

Parâmetros / Complexo	C2P	C3P	C4P	C5P
Fórmula Empírica	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> Cu	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cu	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> Cu	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
M M (g.mol <sup>-1</sup> )	524.13	414.03	584.18	556.13
Temperatura (K)	110(2)	100(2)	110(2)	120(2)
Radiação, λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino / Grupo espacial	Triclinic, <i>P</i> $\bar{1}$	Monoclinic, <i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i>	Orthorhombic, <i>Pbca</i>	Triclinic, <i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> (Å)	8.7513(15)	9.5953 (4)	19.1106(11)	5.1997(18)
<i>b</i> (Å)	11.1557(19)	6.2265 (2)	6.0512(3)	10.474(3)
<i>c</i> (Å)	12.137(2)	17.7017 (7)	22.4801(12)	11.099(4)
α (°)	103.297 (5)	90	90	99.676(13)
β (°)	93.710 (5)	95.227(2)	90	91.067(18)
γ (°)	90.125 (5)	90	90	102.816(13)
Volume (Å <sup>3</sup> )	1150.5(3)	1053.19(7)	2599.6(2)	580.0 (3)
Z / ρ <sub>calc.</sub> (mg.m <sup>-3</sup> )	2; 1.158	2; 1.567	4; 1.493	1; 1.592
Coef. de absorção linear (nm <sup>-1</sup> )	1.158	1.245	1.039	1.160
<i>F</i> (000)	542	430	1212	287
Tamanho do cristal (mm)	0.40 x 0.39 x 0.21	0.26 x 0.23 x 0.18	0.35 x 0.31 x 0.18	0.44 x 0.19 x 0.18
Região de varredura angular θ (°)	2.24 a 33.08	2.31 a 28.72	2.80 a 29.20	2.50 a 29.16
Região de varredura dos índices	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 13, -16 ≤ <i>k</i> ≤ 17, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 17	-12 ≤ <i>h</i> ≤ 12, -8 ≤ <i>k</i> ≤ 8, -23 ≤ <i>l</i> ≤ 23	-26 ≤ <i>h</i> ≤ 24, -8 ≤ <i>k</i> ≤ 8, -30 ≤ <i>l</i> ≤ 30	-7 ≤ <i>h</i> ≤ 7, -14 ≤ <i>k</i> ≤ 14, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 15
Nº de reflexões coletadas/independentes	17095/7634	12366/2731	32585/3506	10994/3075
Integralidade da medida	99.8%	99.8%	99.7%	99.7%
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes	Semi-empírico de equivalentes
<i>T</i> <sub>min</sub> / <i>T</i> <sub>máx</sub>	0.7930/0.6544	0.8051/0.7402	0.9211/0.8874	0.8184/0.6294
Dados/restrições/parâmetros	7634/0/301	2731/0/142	3506/0/169	3075 / 0 / 160
Goodness-of-fit em <i>F</i> <sup>2</sup>	1.099	2.717	1.206	1.109
Índice <i>R</i> <sub>int</sub>	0.0628	0.0262	0.0334	0.0190
<i>R</i> <sub>1</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )] e <i>wR</i> <sub>2</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	0.1734/0.4496	0.0863/0.3131	0.0481/0.1133	0.0388/0.1247
<i>R</i> <sub>1</sub> e <i>wR</i> <sub>2</sub> (todos os dados)*	0.1926	0.1013 / 0.3241	0.0556/0.1171	0.0402/0.1307
ρ <sub>max</sub> (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> ) / ρ <sub>min</sub> (e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup> )	1.234 and -1.776 e·Å <sup>-3</sup>	1.198 and -2.235 e·Å <sup>-3</sup>	0.698 and -0.764 e·Å <sup>-3</sup>	1.489 and -0.964 e·Å <sup>-3</sup>

## ANEXO 3 – ESPECTROS DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA NA REGIÃO UV/VIS EM SOLUÇÃO DOS COMPLEXOS

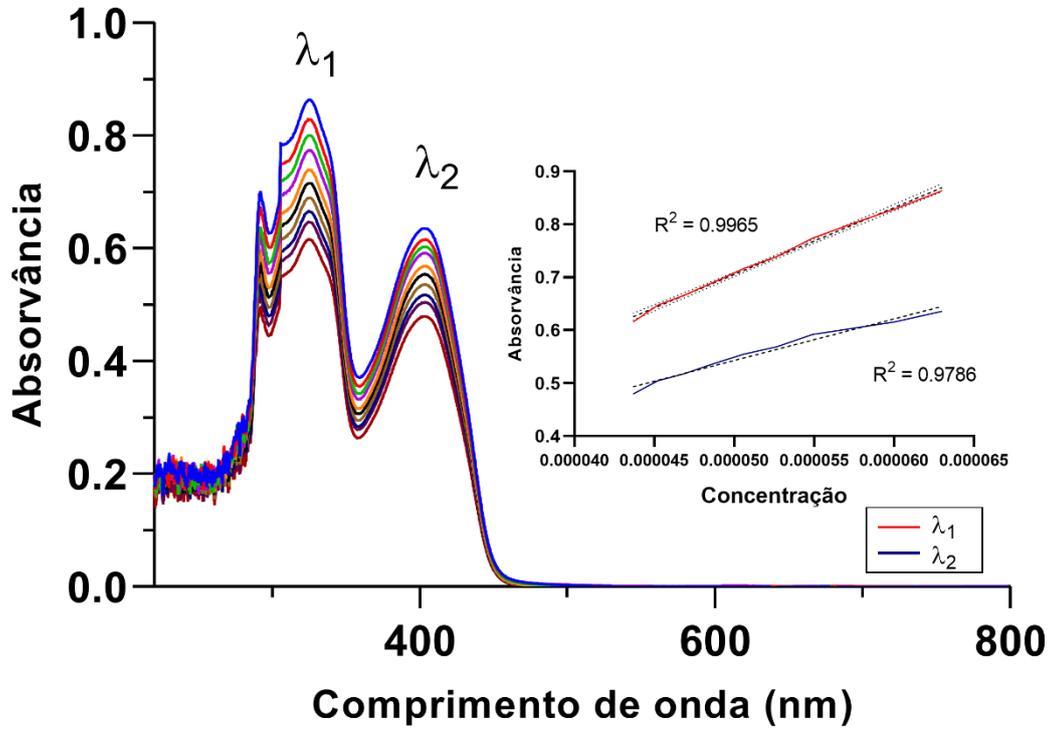


[ ] inicial = 0,002957 mol.L<sup>-1</sup>

T = 25°C

	nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	326.2	$Y = 11104 \cdot X + 0,009662$	11104 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	403,6	$Y = 6743 \cdot X + 0,2043$	6743 mol. L <sup>-1</sup>

## C2AS

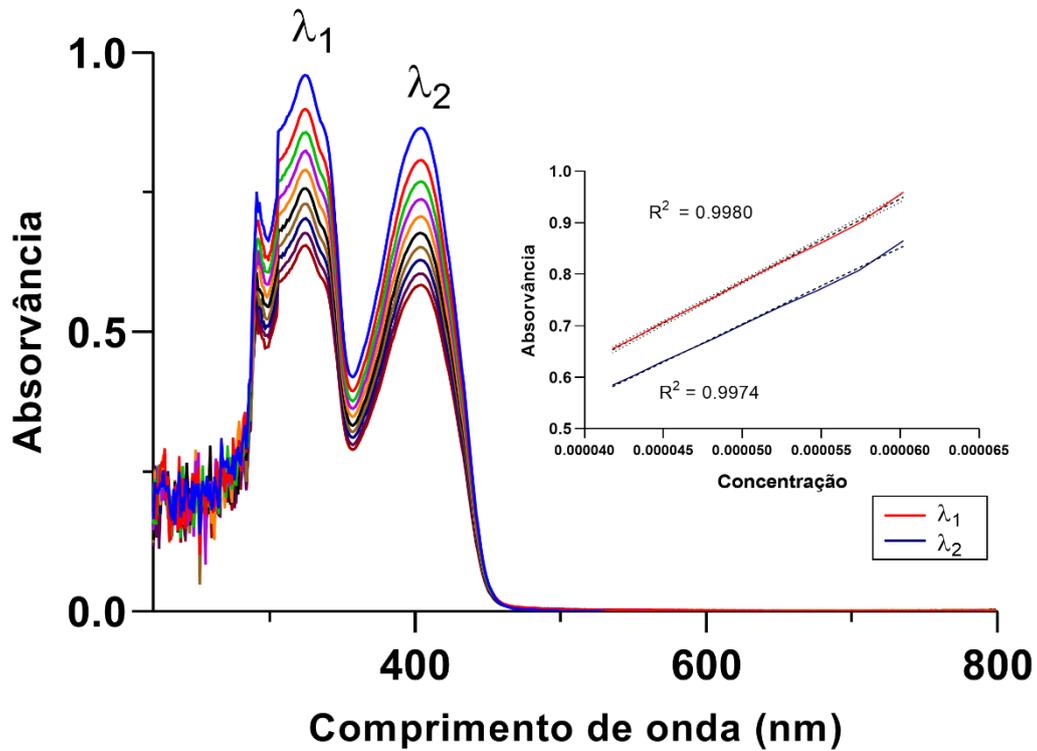


[ ] inicial = 0,003662 mol.L<sup>-1</sup>

T = 25°C

	nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	325,2	$Y = 12628 \cdot X + 0,07395$	12628 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	403,6	$Y = 7856 \cdot X + 0,1500$	7856 mol. L <sup>-1</sup>

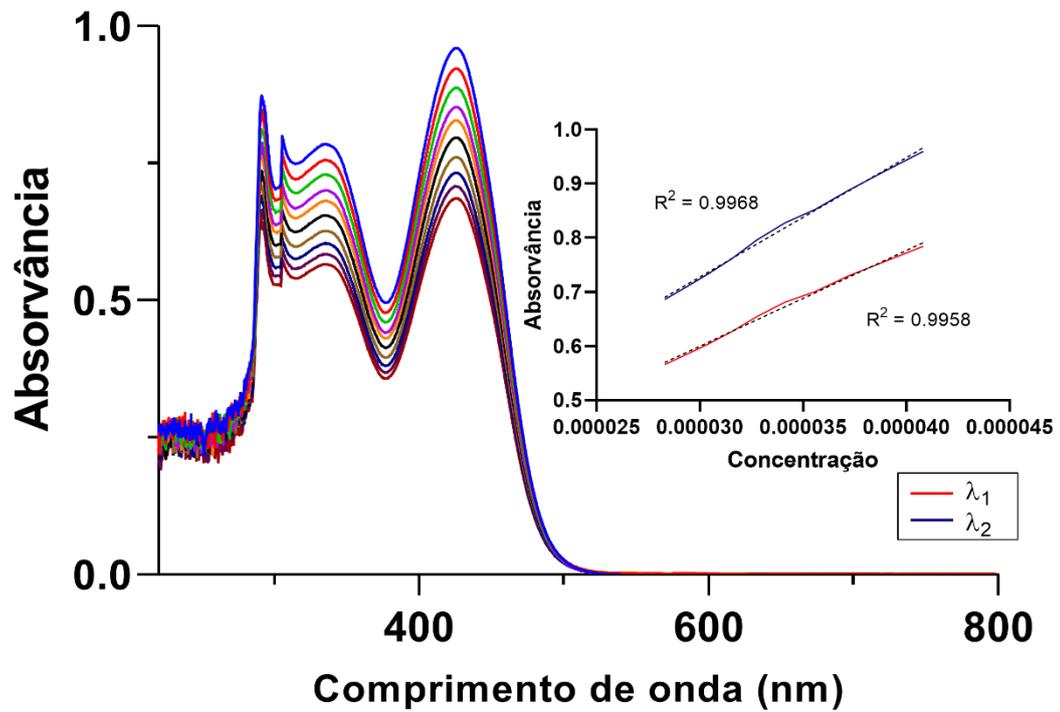
## C3AS



[ ] inicial = 0,003071 mol.L<sup>-1</sup>  
T = 25 °C

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	325	$Y = 16103 \cdot X - 0,01954$	16103 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	404	$Y = 14805 \cdot X - 0,03684$	14805 mol. L <sup>-1</sup>

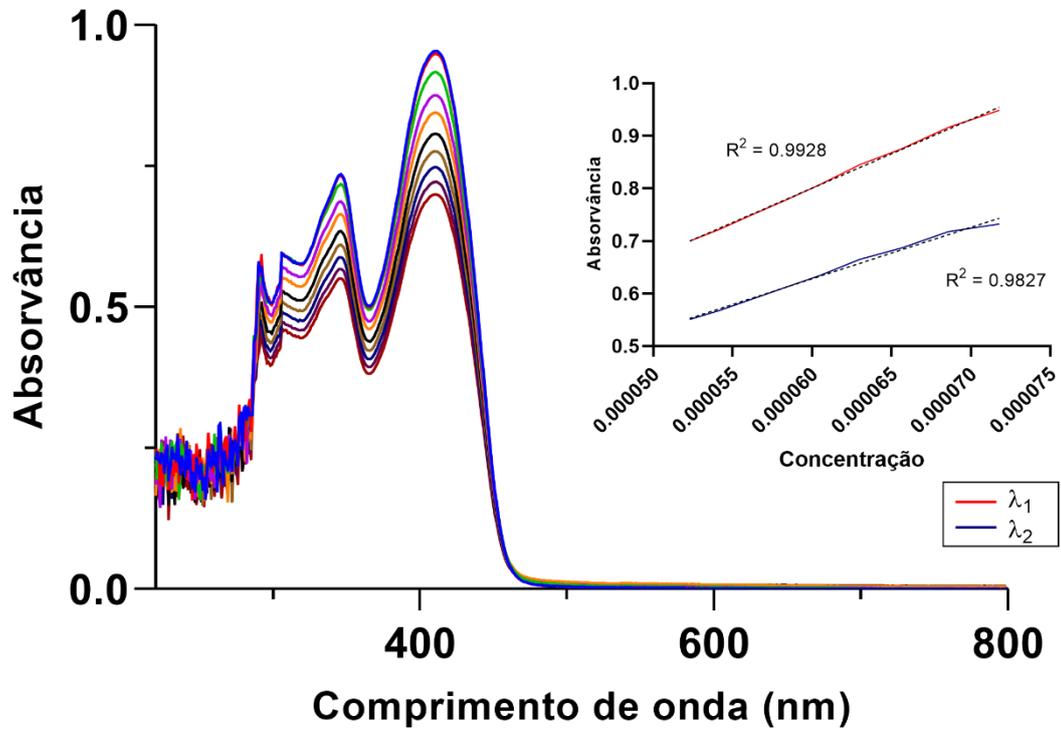
## C4AS



[ ] inicial = 0,002374 mol.L<sup>-1</sup>  
T = 25 °C

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	335.8	$Y = 22077 \cdot X + 0,06511$	22077 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	425.8	$Y = 17699 \cdot X + 0,06855$	17699 mol. L <sup>-1</sup>

## C5AS

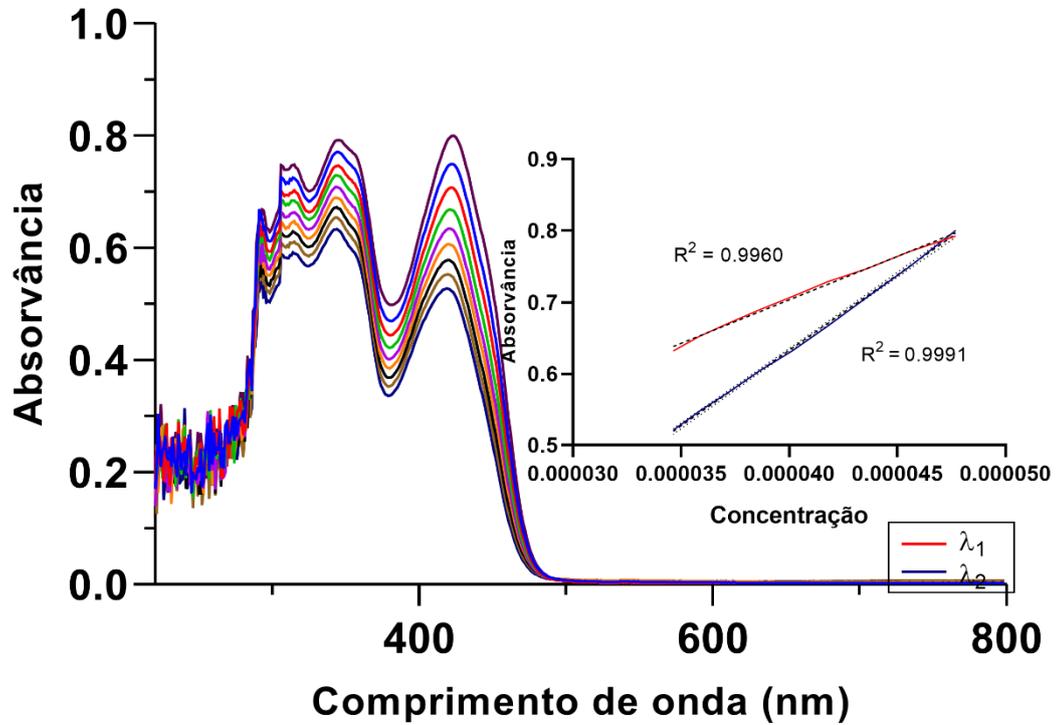


[ ] inicial = 0,003422 mol.L<sup>-1</sup>

T = 25 °C

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	346	$Y = 8768 \cdot X + 0,1003$	8768 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	410	$Y = 11967 \cdot X + 0,08060$	11967 mol. L <sup>-1</sup>

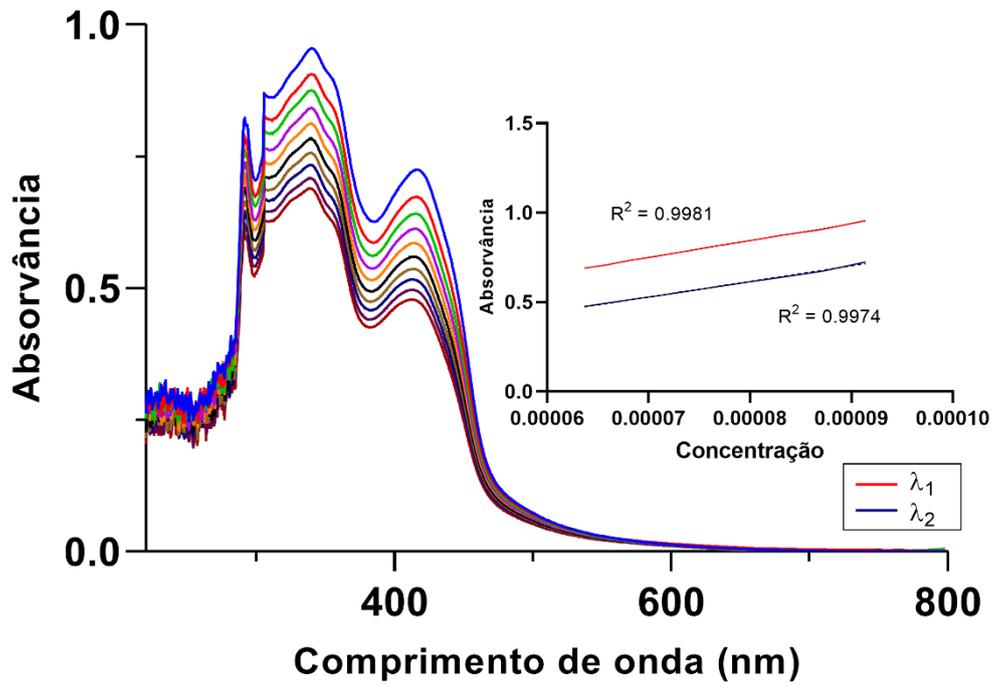
## C1P



[ ] inicial = 0,005057 mol.L<sup>-1</sup>  
T = 25 °C

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	345	$Y = 12157 \cdot X + 0,2170$	12157 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	423	$Y = 21122 \cdot X - 0,2121$	21122 mol. L <sup>-1</sup>

## C2P

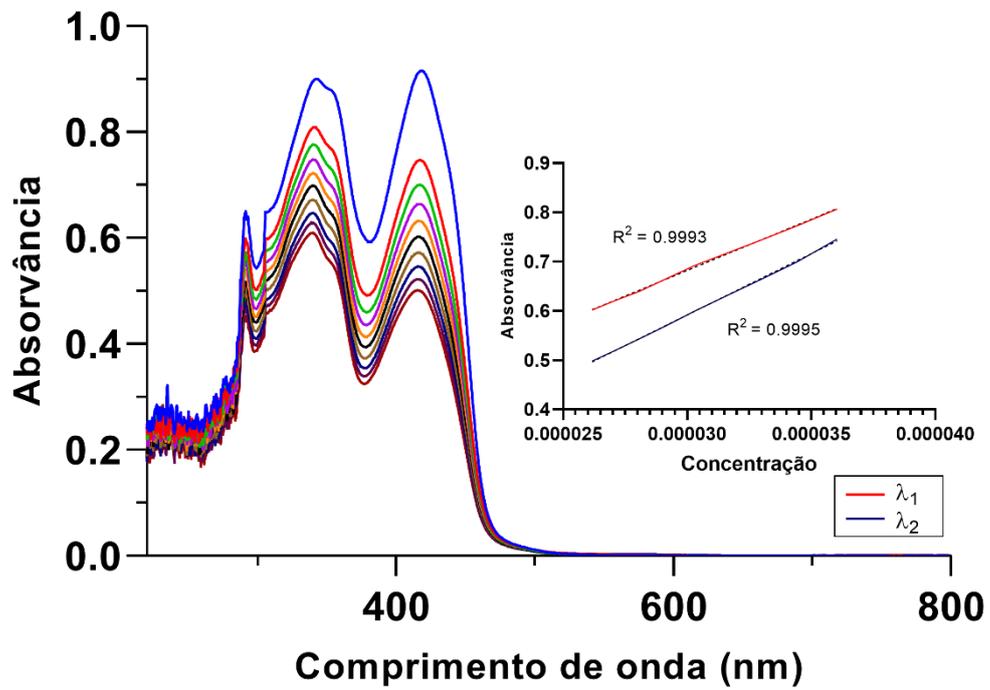


[ ] inicial = 0,002903 mol.L<sup>-1</sup>

T = 25 °C

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	339,8	Y = 9486*X + 0,08497	9486 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	416.6	Y = 8731*X - 0,08292	8731 mol. L <sup>-1</sup>

## C3P

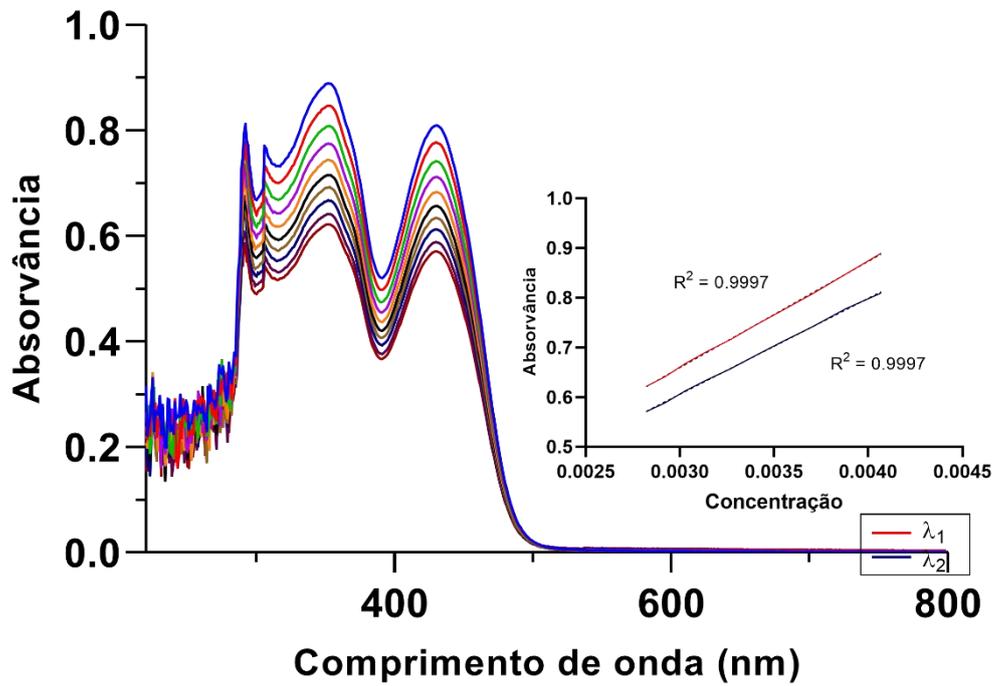


[ ] inicial = 0,003821 mol.L<sup>-1</sup>

T = 25 °C c3p

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	342,8	$Y = 20794 \cdot X + 0,05839$	20794 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	418,4	$Y = 24886 \cdot X - 0,1547$	24886 mol. L <sup>-1</sup>

## C4P

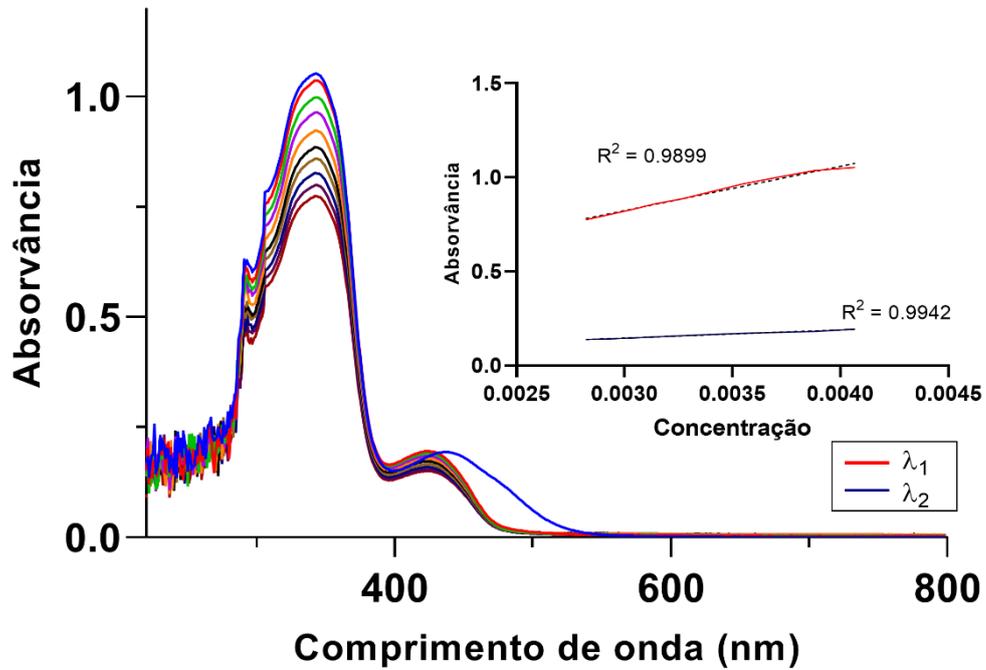


[ ] inicial = 0,00414 mol.L<sup>-1</sup>

T = 25 °C c4p

	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	352	$Y = 213,6 \cdot X + 0,01884$	213,6 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	430	$Y = 192,9 \cdot X + 0,02748$	192,9 mol. L <sup>-1</sup>

## C5P

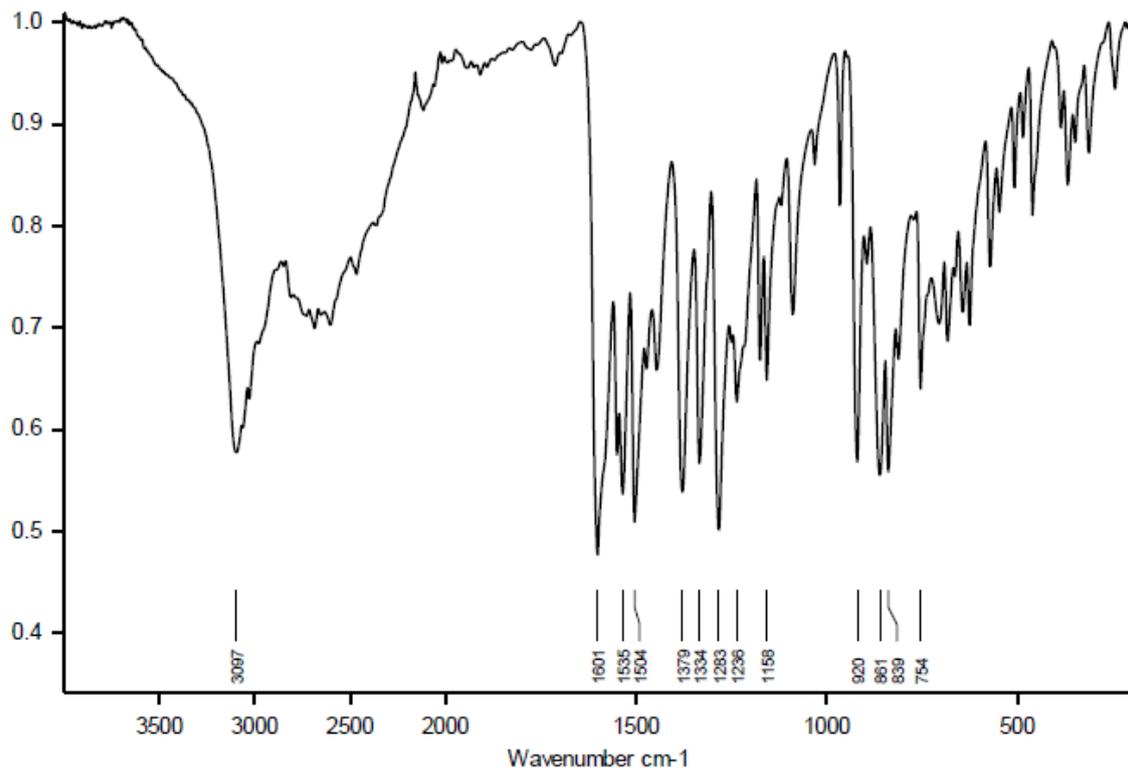


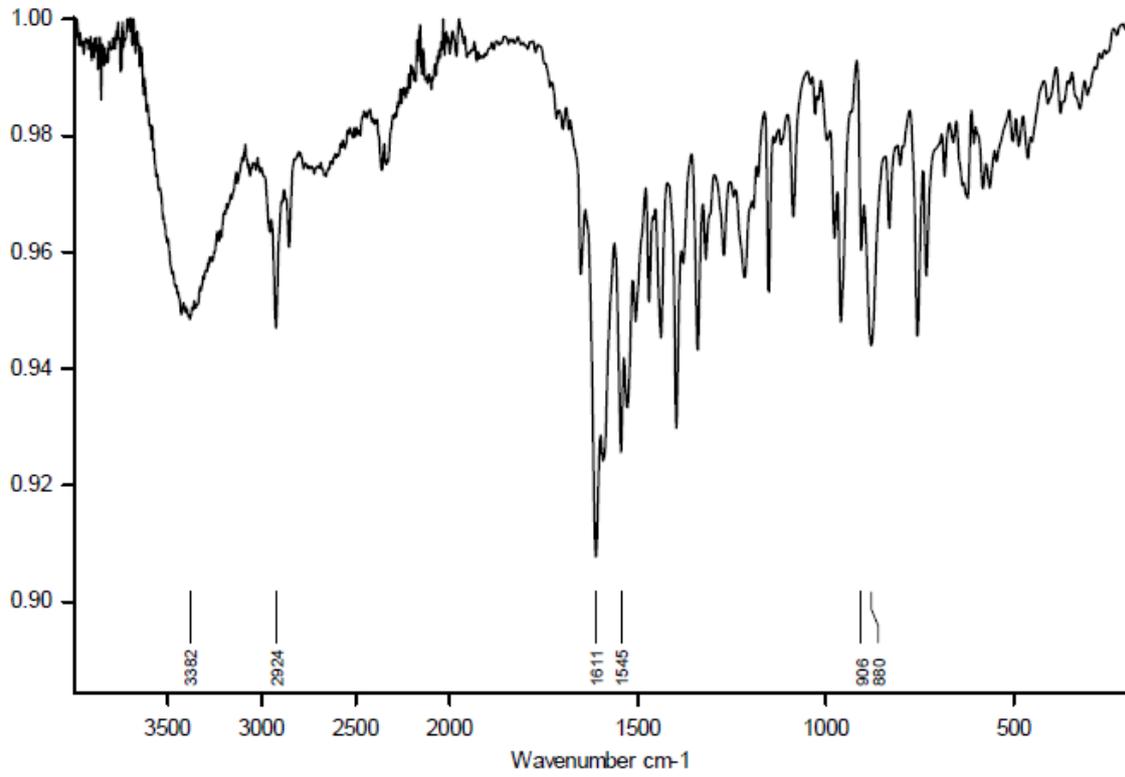
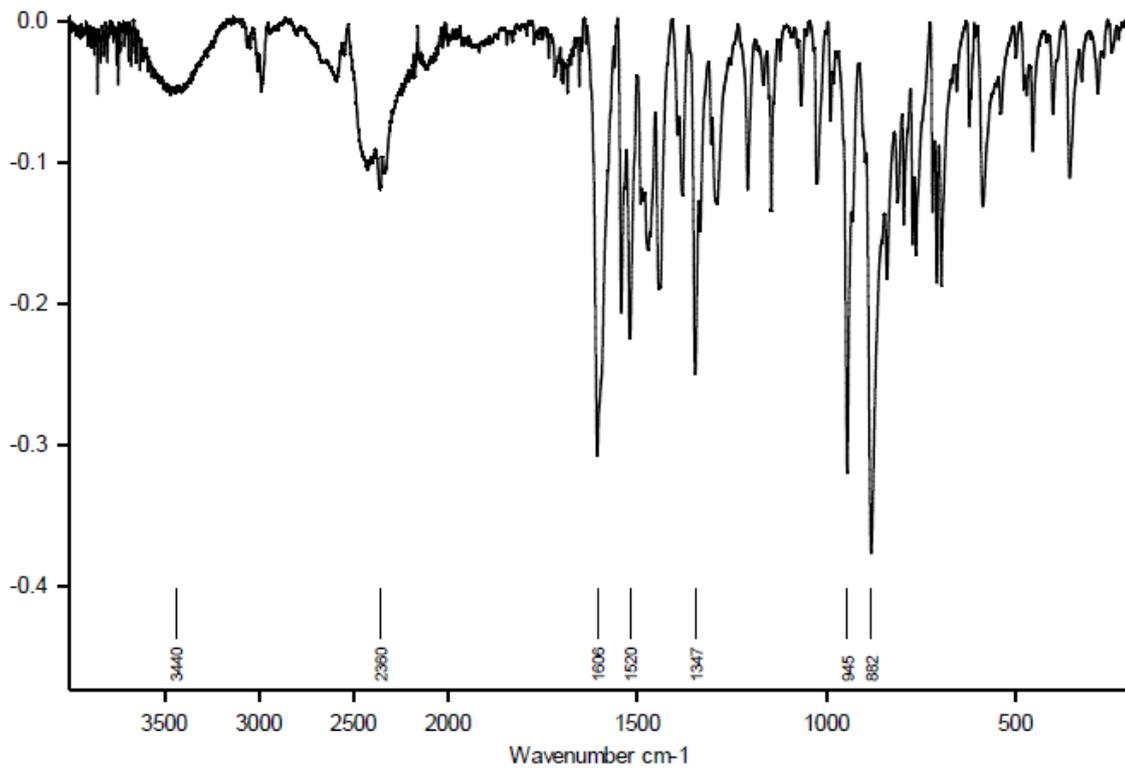
[ ] inicial = 0,00414 mol.L<sup>-1</sup>  
T = 25 °C

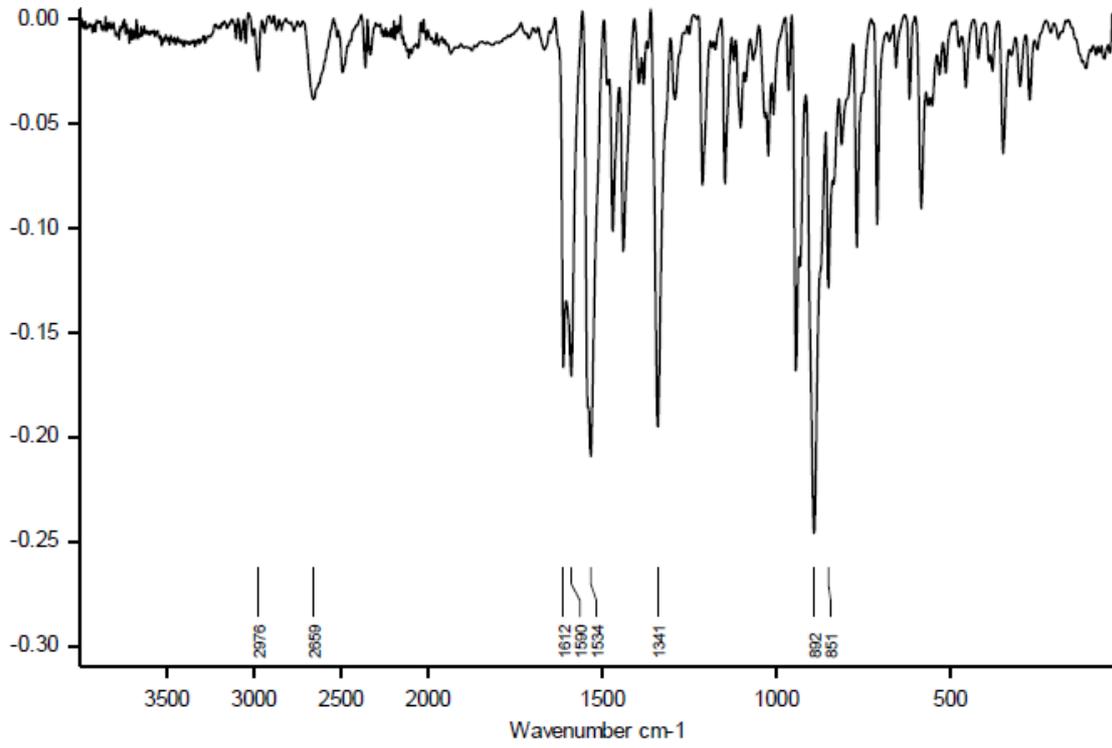
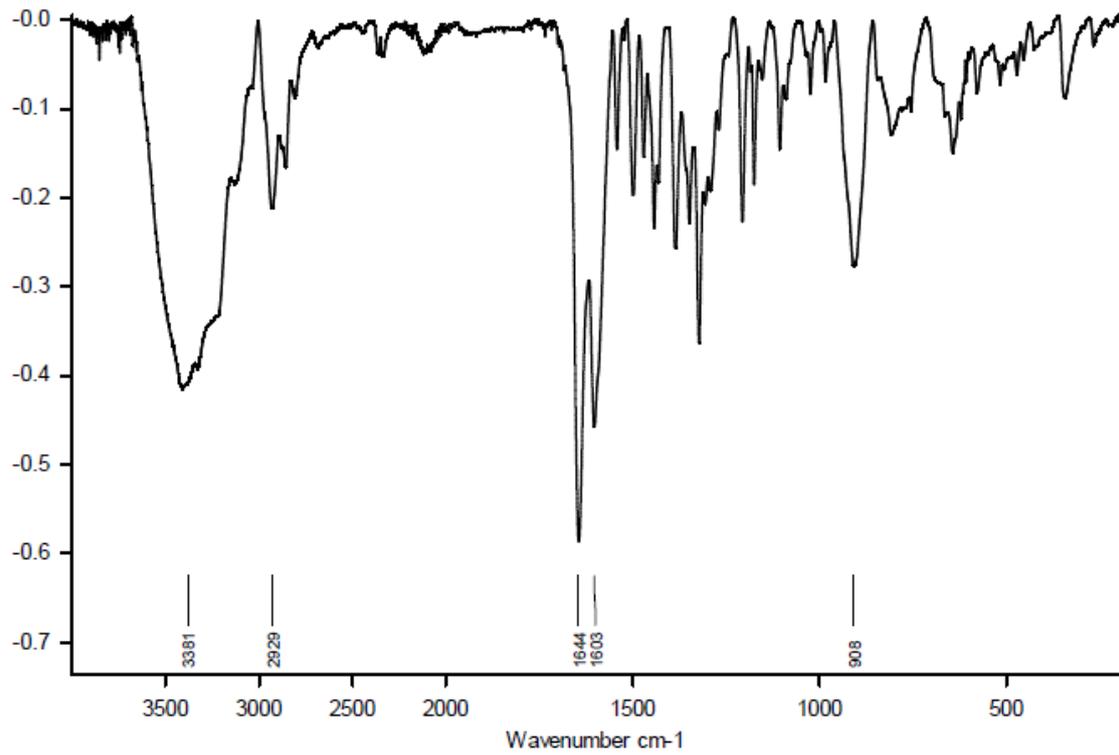
	Nm	Equação da reta	Absortividade Molar $\epsilon$
$\lambda_1$	343	$Y = 235,6 \cdot X + 0,1163$	235,6 mol. L <sup>-1</sup>
$\lambda_2$	436	$Y = 43,42 \cdot X + 0,01528$	43,42 mol. L <sup>-1</sup>

## ANEXO 4 - ESPECTROS DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DOS COMPLEXOS

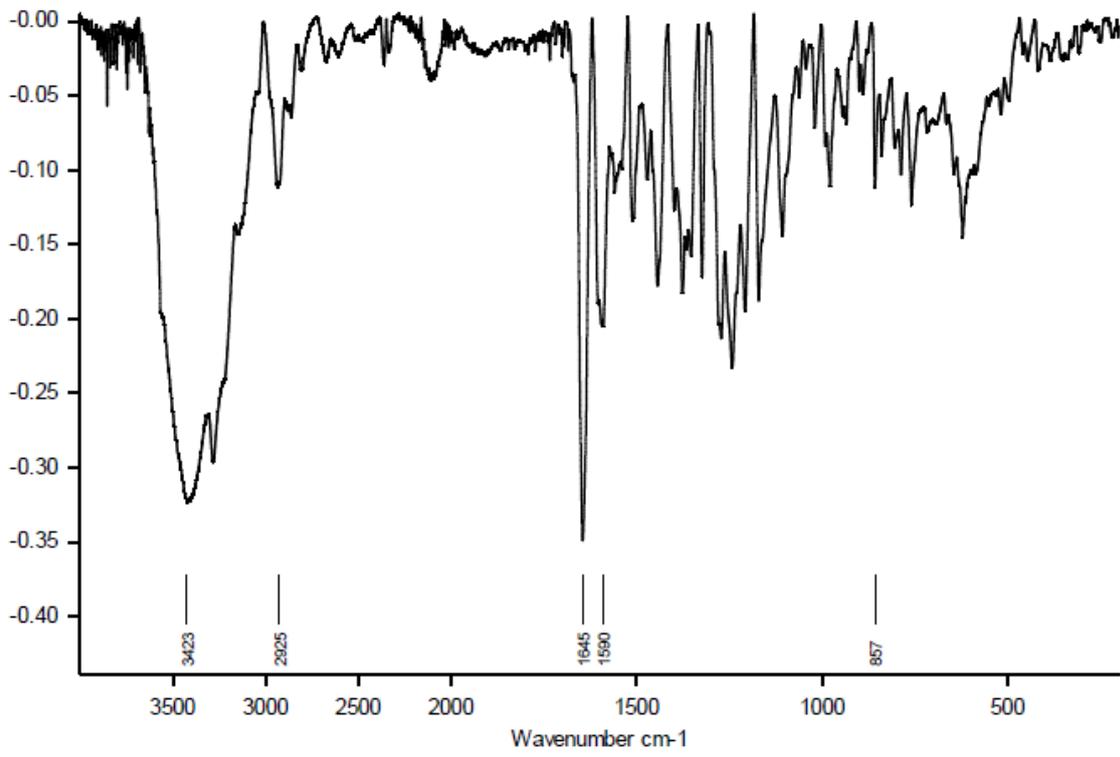
### CIAS



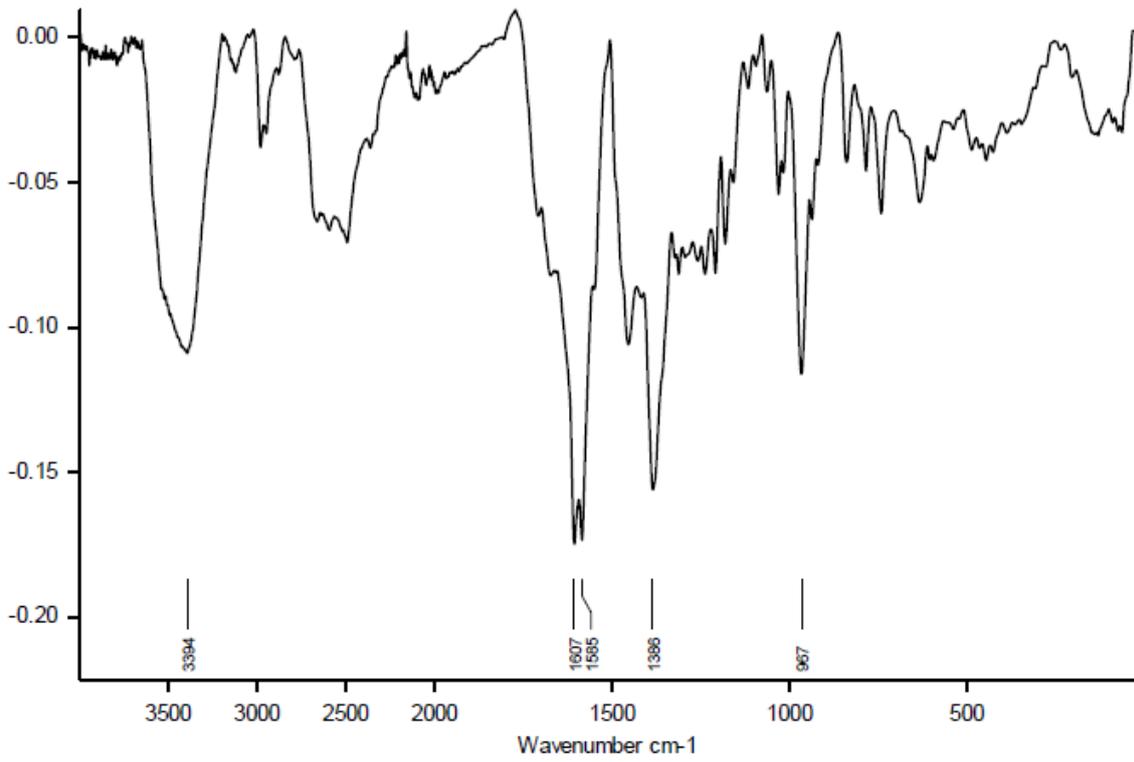
**C2AS****C3AS**

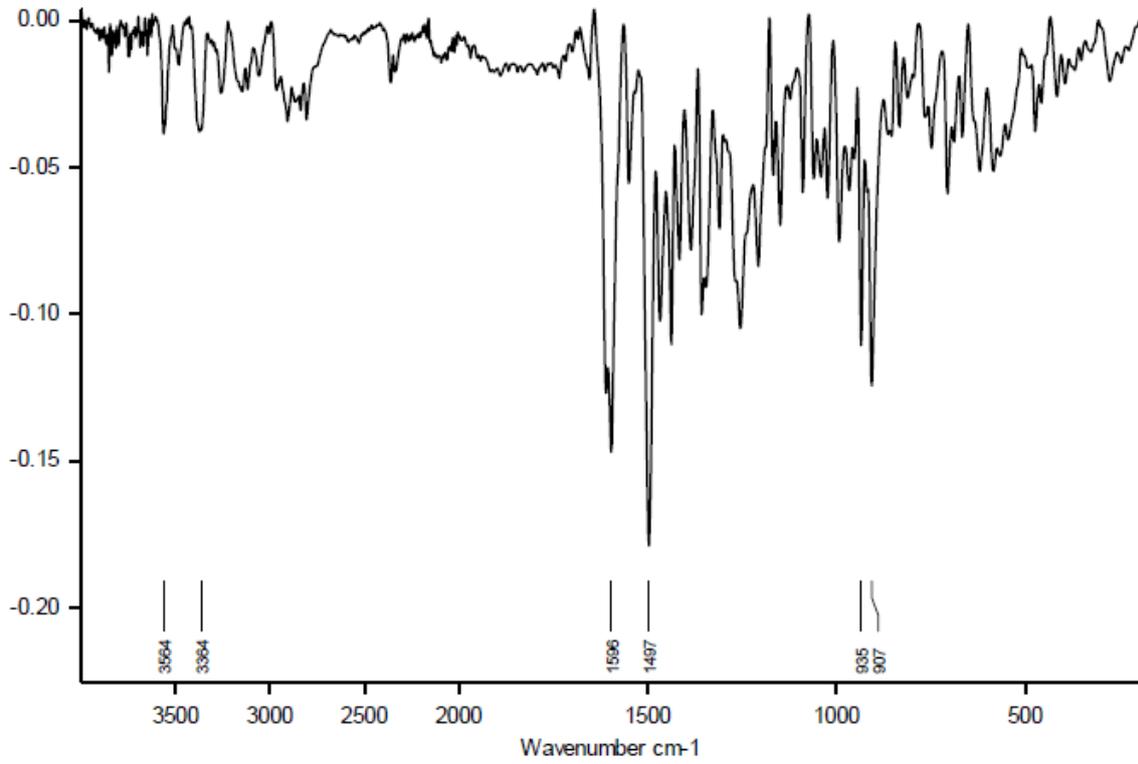
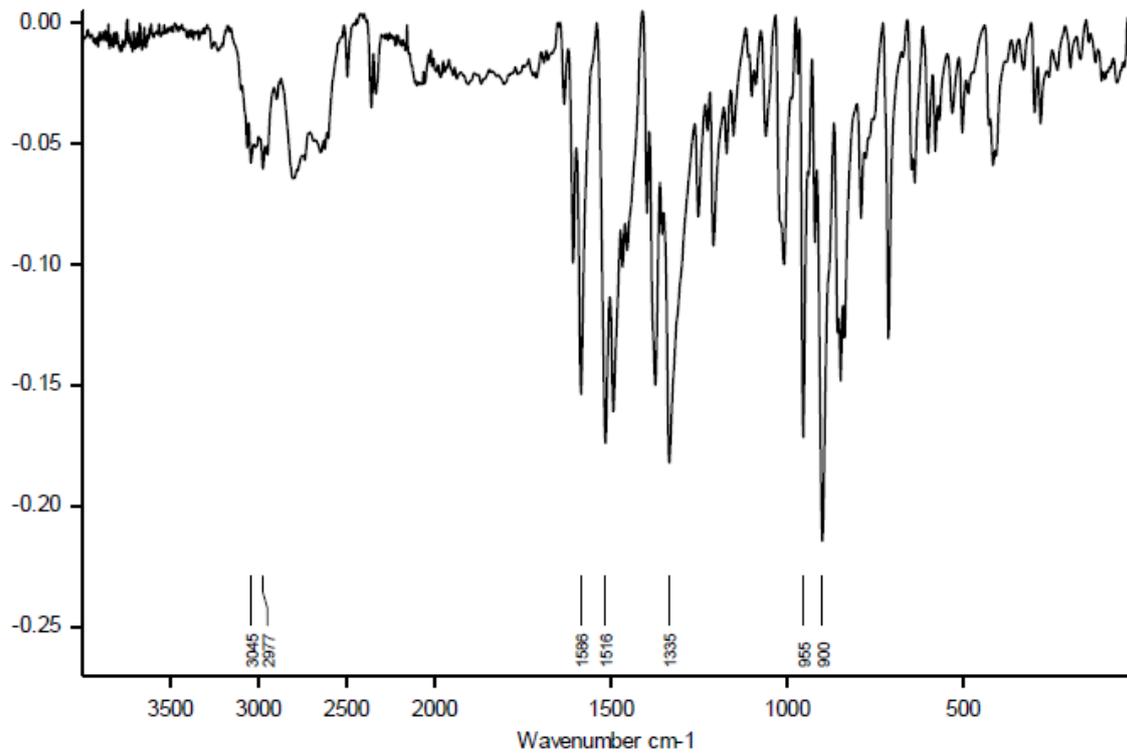
**C4AS****C5AS**

**C1P**



**C2P**



**C3P****C4P**

**C5P**

