UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FÍSICO-QUÍMICA E INORGÂNICA

Manuela Alves Vinhas

Complexo de prata(I) contendo a tiossemicarbazona derivada da vanilina: síntese, avaliação da atividade antiproliferativa e estudos de interação com o DNA

Araraquara
2022

Manuela Alves Vinhas

Complexo de prata(I) contendo a tiossemicarbazona derivada da vanilina: síntese, avaliação da atividade antiproliferativa e estudos de interação com o DNA

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestrado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
Co-orientador: Dr. *rer*. *nat*. Adriano Bof de Oliveira

Araraquara
2022

V784c

Vinhas, Manuela Alves

Complexo de prata(I) contendo a tiossemicarbazona derivada da vanilina : síntese, avaliação da atividade antiproliferativa e estudos de interação com o DNA / Manuela Alves Vinhas. -- Araraquara, 2022

90 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Adriano Bof de Oliveira

1. Compostos de prata. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Citotoxicidade. 4. Câncer. 5. DNA. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Complexo de prata (I) contendo a tiossemicarbazona derivada da vanilina: síntese, avaliação da atividade antiproliferativa e estudos de interação com o DNA.

AUTORA: MANUELA ALVES VINHAS
ORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO
COORIENTADOR: ADRIANO BOF DE OLIVEIRA

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

Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Quimica Analitica Fisico-Quimica e Inorganica / Instituto de Quimica - UNESP - Araraquara

Dr. RENAN LIRA DE FARIAS (Participaçao Virtual)
Instituto de Química / Universidade Federal de Goiás - UFG - Goiânia

Dr. NIVALDO BORALLE (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 06 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES

Manuela Alves Vinhas

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

Formação Acadêmica

2019-2022 Mestrado em Química

- Grande área: Ciências Exatas e da Terra.
- Subárea: Química Inorgânica / Especialidade: Compostos organo-metálicos.
- Título: Desenvolvimento de complexo de prata(I) contendo ligantes tiossemicarbazona e Trifenilfosfina com atividade potencial antitumoral
- Orientador: Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (Adelino.netto@iq.unesp.br).
- Co-orientador: Dr. *rer*. *nat*. Adriano Bof de Oliveira (Adriano.bof.de.oliveira@gmail.com)
- Agência financiadora: CAPES.

2014-2019 Graduação em Bacharelado em Química

Iniciação científica

2016-2017

- Grande área: Química analítica.
- Grupo LCP, laboratório de componentes poluentes.
- Orientador: Professor Dr. Marcelo da Rosa Alexandre.

2018-2019

- Grande área: Química computacional
- Laboratório POPLE
- Orientador: Professor Dr. Ricardo Oliveira Freire

Experiência Profissional e Didática

2017-2018 Monitoria- UFS

- Monitoria na disciplina de química analítica.
  Supervisão: Professor Dr. Marcelo da Rosa Alexandre

Produções

- Artigo científico: Distribution patterns of aliphatic hydrocarbons in sediments from a tropical estuarine system
  https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X19307556

Participação em eventos

- 2014 VII Bienal da sociedade brasileira de matemática
- 2015 Minicurso: O estado da arte da RMN no Brasil
- 2015 aplicação das técnicas de RMN hifenadas (clae-uv-efs-rmn eclae-uv-rmn) na identificação dos metabólitos presentes nos extratos dos chás dediferentes genótipos de lippia gracilis schauer.
- 2015 espécies químicas contendo o elemento enxofre: de semi e supercondutores moleculares até compostos sintéticos com atividade farmacológica
- 2015 I escola de química UFSCAR-UFS
- 2016 II escola de química UFSCAR/UFS
- 2017 III escola de química UFSCAR/UFS
- 2021 I workshop do grupo de materiais Inorgânicos do triângulo.
- 2021 Um olhar da química de produtos naturais: antibióticos em foco.
- 2021 Semana da química: uma viagem química pelas nossas emoções e sentimentos.
- 2021 Semana para sensibilização e defesa da educação inclusiva

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Nancy e Manoel, por sempre se fazerem presente em minha vida, e ao meu namorado Raone por todo apoio. Amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, pela confiança em mim depositada, pela compreensão e pela oportunidade de desenvolvimento. Muito obrigada por tudo, por todos os ensinamentos, aqui eu pude crescer e desenvolver minhas habilidades.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Adriano Bof de Oliveira, pela amizade, ensinamentos, compreensão e dedicação. Enfim, um amigo que tive sorte em ter em minha vida. Obrigada por sempre acreditar em mim, em meu potencial, sempre serei grata por tudo.

Aos meus pais Manoel e Nancy, sem vocês eu não estaria realizando esse sonho.

Ao meu namorado Raone, por sempre me apoiar em todos os momentos.

Ao Nivaldo, pelos experimentos de RMN e por sempre ter um tempinho para me aconselhar. O senhor foi fundamental.

A todos os técnicos do Instituto de Química da UNESP Araraquara, em especial ao meu amigo Rafael R. Domeneguetti, pelos espectros de infravermelho.

Ao Prof. Dr. Fillipe V. Rocha (UFSCar), pelos ensaios de viabilidade celular.

Ao Prof. Dr. Javier Alcides Ellena (IFSC-USP) pelas medidas de difração de raios X.

A Jécika, uma amiga que tive prazer em conhecer nessa caminha que tanto me ajudou e que me fez rir com seu jeito de ser.

Ao Renan Lira, meu conterrâneo, um amigo arretado de bom! Obrigado por compartilhar seu conhecimento comigo.

Aos companheiros de laboratório, Ana Beatriz, Ana Polez, Bárbara, Renan Zanetti, Debora, Andressa e Vladimir que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNESP pela excelente infraestrutura oferecida.

À Capes, pela bolsa de mestrado concedida.

À Deus por permitir essa realização.

Muito Obrigada!

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

Marie Curie

RESUMO

O câncer é termo genérico que abrange uma variedade de doenças, seu diagnostico representa em sua maioria um prognostico ruim, pois o câncer esta associado à uma das principais causas de morte em todo o mundo. Desse modo, o desenvolvimento de novos quimioterápicos para um tratamento mais adequado é de vital importância. Nesse contexto, foi desenvolvido um novo complexo de prata contendo ligantes de interesse biológico, de formula $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]$, onde PPh3 = trifenilfosfina e VMTSC=(E)-N-etil-2-(3-metoxi-4-[2-(1-morfolinil)etóxi]benzadeíldo tiossemicarbazona. Os compostos foram caracterizados através das técnicas espectroscópicas de infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C e ^{31}P. As formulas mínimas e purezas dos compostos foram determinadas através de análise elementar e os cristais obtidos do complexo foram submetidos a experimentos de difração de raios X por monocristal o qual revelou sua estrutura cristalina. A citotoxicidade in vitro dos compostos foi determinada frente as linhagens tumorais A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), A549 (tumoral de pulmão), HepG2 (tumoral de fígado), MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativo) e MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal). O complexo foi ativo contra todas as linhagens tumorais, sendo mais ativo contra a linhagem A2780cis, IC_{50} = 0,428 ± 0,008 µM, linhagem com resistência a cisplatina. Ensaios de interação com o ctDNA por titulação espectroscópica, dicroísmo circular e ensaios de ligação competitiva evidenciaram que o complexo $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]$ consegue interagir com ctDNA, tornando o ctDNA um possível alvo.

Palavras chaves: complexos de prata, tiossemicarbazonas, câncer, trifenilfosfina.

Abstract

Cancer is a generic term that covers a variety of diseases, its diagnosis represents mostly a bad prognosis, as cancer is associated with one of the main causes of death worldwide. Thus, the development of new chemotherapeutic agents for a more adequate treatment is of vital importance. In this context, a new silver complex containing ligands of biological interest was developed, with the formula [AgCl(VMTSC)(PPh3)2], where PPh3 = triphenylphosphine and VMTSC=(E)-N-ethyl-2-(3-methoxy-4-[2-(1-morpholinyl)ethoxy]benzadeyldo thiosemicarbazone. The compounds were characterized by infrared spectroscopic techniques with Fourier transform, ^{1}H, ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. The minimum formulas and purities of the compounds were determined through elemental analysis and the crystals obtained from the complex were subjected to X-ray diffraction experiments by single crystal which revealed its crystalline structure. The in vitro cytotoxicity of the compounds was determined against the tumor lines A2780cis (cisplatin-resistant ovarian tumor), A549 (lung tumor), HepG2 (liver tumor), MDA-MB-231 (triple-negative breast tumor) and MRC5 (non-tumor lung of fetal origin). The complex was active against all tumor strains, being more active against the A2780cis strain, IC50 = 0.428 ± 0.008 μM, a strain with resistance to cisplatin. Interaction assays with ctDNA by spectroscopic titration, circular dichroism and competitive binding assays showed that the complex [AgCl(VMTSC)(PPh3)2] can interact with ctDNA, making ctDNA a possible target.

Keywords: silver complexes, thiosemicarbazones, cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa do número de câncer por tipo de câncer no Brasil. **Fonte:** [6].19
Figura 2: Estruturas de complexos de platina. **Fonte:** autor. 22
Figura 3: Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A (esquerda) e KP1019 (direita). **Fonte:** Autor.....23
Figura 4: Estruturas dos complexos dicloreto de titanoceno (esquerda) e Aurofina (direita). **Fonte:** Autor.....24
Figura 5: Estrutura química do complexo KP46. **Fonte:** Autor. 24
Figura 6: Esquema representativo do mecaismo de ação dos íons Ag+. **Fonte:** Adaptado de [27]. 26
Figura 7: Estutura química do Sulfadiazina de Prata(I). **Fonte:** Autor. 27
Figura 8: Estrutura de complexos de prata(I) sintetizados por Banti et al. **Fonte:** autor.....28
Figura 9: Estrutura geral das tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.....29
Figura 10: Tiossemicarbazonas em suas formas neutra (tiona-tiol) e aniônica. **Fonte:** Autor. 30
Figura 11: Formas de coordenação para tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor. 31
Figura 12: Estrutura linear da tiossemicarbazona Triapina. **Fonte:** Autor.....32
Figura 13: Estrutura química da tiossemicarbazona COTI-2 (esquerda) e DpD (direita). **Fonte:** Autor.....33
Figura 14: Estruturas químicas de ligantes tiossemicarbazonas L1, L2 e L3, e seus respectivos complexos de gálio(III), C1, C2 e C3. **Fonte:** [55] 35
Figura 15: Estrutura do cátion trifenilfosfónio. **Fonte:** autor.....36
Figura 16: Estrutura dos complexos $[HB(pz)_3]Ag(PPh_3)$ e $[Ag(PPh_3)_4]BF_4$, respectivamente. **Fonte:** autor. 38
Figura 17: Mecanismo de formação da vanilina funcionalizada. **Fonte:** Autor. 47
Figura 18: Mecanismo de formação da tiossemicarbazona VMTSC. **Fonte:** Autor. 48
Figura 19: Espectro de infravermelho obtido para o ligante VMTSC. **Fonte:** Autor. 50
Figura 20: Espectro do ligante VMTSC livre em preto (1) e do complexo com fórmula $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]$ (2). **Fonte:** Autor. 53
Figura 21: Espectro do ligante trifenilfosfina PPh_3. **Fonte:** Autor.....54
Figura 22: Numeração adotada para a estrutura do ligante VMTSC. **Fonte:** Autor. 56

Figura 23: Espectro de RMN de ^{1}H (14,1 T) do ligante VMTSC em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....57
Figura 24: Espectro de RMN do experimento TOCSY 1D (14,1 T) com irradiação do sinal em 1,16 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....59
Figura 25: Espectro de RMN do experimento TOCSY 1D (14,1 T) com irradiação no sinal 4,46 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....59
Figura 26: Espectro de RMN do experimento NOESY 1D (14,1 T) para o sinal 4,46 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....60
Figura 27: Mapa de contorno HMBC 1H-15N (14,1 T) obtido para o ligante VMTSC, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....61
Figura 28: Espectro de RMN COSY (14,1 T) para o ligante VMTSC, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....62
Figura 29: Representação da conformação cadeira do anel morfolina. **Fonte:** Autor 62
Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C para o ligante VMTSC (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....64
Figura 31: Representação da estrutura proposta para o complexo [AgCl(VMTSC)$(PPh_3)_2$] com a numeração adotada. **Fonte:** Autor.....65
Figura 32: Espectro de RMN de 1H do complexo [AgCl(VMTSC)$(PPh_3)_2$] (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....66
Figura 33: Espectro de RMN ^{31}P para o complexo [AgCl(VMTSC)$(PPh_3)_2$] (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....66
Figura 34: Experimento de TOCSY 1D (14,1 T) para o complexo irradiando o sinal em 1,16 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....68
Figura 35: Experimento de TOCSY 1D (14,1 T) para o complexo irradiando o sinal em 4,41 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....68
Figura 36: Experimento de TOCSY 1D (14,1 T) para o complexo com irradiação no sinal em 7,49 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....69
Figura 37: Experimento de NOESY 1D (14,1 T) para o complexo com irradiação no sinal em 7,08 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte**: Autor.....69
Figura 38: Experimento de NOESY 1D (14,1 T) para o complexo com irradiação no sinal em 3,86 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....70
Figura 39: Espectro de RMN ^{1}H coletados nos tempos 0, 24 e 48h para o complexo de Ag(I), (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.....72

Figura 40: Projeção ORTEP dos complexos mostrando a numeração dos átomos ao redor do centro metálico Ag(I) e dos principais átomos do ligante tiossemicarbazona. **Fonte:** Autor.....73
Figura 41: Redução da enzima MTT em Formazan. **Fonte:** Adaptado de [79].....75
Figura 42: Espectros de Uv-vis do complexo de prata M1 em tampão tris-HCl (pH 7,4) na presença de quantidades crescentes de ctDNA. **Fonte:** Autor.....79
Figura 43: Estruturas de raios-X de A-, B- e Z-DNA dos arquivos PDB 1VJ4, 1BNA e 2DCG respectivamente. **Fonte:** [77] 80
Figura 44: Espectros de CD do DNA livre e na presença do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] em tampão tris-HCl. **Fonte:** Autor. 81
Figura 45: Estrutura do Hoechst 33258 e a representação da ligação do Hoechst 33258 ao sulco menor do B-DNA. **Fonte:** [78] 82
Figura 46: Espectro de emissão do complexo Hoechst-ctDNA na presença do complexo de prata (6 – 60 μM) em tampão tris-HCl (pH 7,4). **Fonte:** Autor 83

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Metais por grupo que apresentam complexos de tiossemicarbazonas. **Fonte:** [54].....34
Tabela 2: Dados físicos e rendimentos dos compostos sintetizados. **Fonte:** Autor. 49
Tabela 3: Dados de análise elementar (CHN) para os compostos sintetizados. **Fonte:** Autor.....49
Tabela 4: Dados de infravermelho obtido para o ligante VMTSC livre e para o complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]. **Fonte:** Autor.....55
Tabela 5: Dados gerais de RMN caracterizados para o ligante VMTSC. **Fonte:** Autor 64
Tabela 6: Deslocamentos químicos e atribuições dos sinais adquiridos pelos experimentos de RMN 1H para o complexo. **Fonte:** Autor.....71
Tabela 7: Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (º) associados ao centro metálico do complexos de prata(I). **Fonte:** autor.....73
Tabela 8: Valores de IC50 (μM) do complexo de prata(I) e de seu respectivo ligante tiossemicarbazona., onde M1=[AgCl(VMTSC)(PPh3)2] e SI= Índice de seletividade . **Fonte:** Autor.....76

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema de modificação estrutural baseado em molécula protótipo. **Fonte:** Autor.....39

Esquema 2: Reações para síntese do ligante VMTSC. **Fonte:** Autor.....44

Esquema 3: Reação para síntese do complexo de fórmula [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]. **Fonte:** Autor.....46

Esquema 4: Rota de síntese do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]Cl. **Fonte**: Autor. 49

LISTAS DE ABREVIATURAS

A2780cis	tumoral de Ovário
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism*)
ctDNA	Ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro (*Calf thymus*)
COSY	*Correlation Spectroscopy*
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
FDA	*Food and Drug Administration*
HepG2	tumoral de fígado
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC	*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
IC50	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama triplo negativo
MRC5	não tumoral de pulmão
PPh_3	Trifenilfosfina
RR	ribonucleotídeo redutase
ROS	Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
Top2	topoisomerase II
TSC	Tiossemicarbazona
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 17
   1.1 Câncer 17
   1.2 Estatísticas 18
   1.3 Tratamento 19
   1.4 Complexos metálicos no tratamento do câncer 20
   1.5 Prata 25
      1.5.1 Compostos de prata(I) 25
   1.6 Tiossemicarbazonas 29
      1.6.1 Aspectos químicos 29
      1.6.2 Atividade biológica 31
      1.6.3 Complexos metálicos 33
   1.7 Ligantes fosfínicos no desenvolvimento de complexos bioativos 35
   1.8 Hipótese do trabalho 38
2. **OBJETIVOS** 40
   2.1 Objetivo Geral 40
   2.2 Objetivo específicos 40
3. **PARTE EXPERIMENTAL** 41
   3.1 Reagentes 41
   3.2 Instrumentação 41
   3.3 Síntese dos compostos 44
      3.3.1 Síntese do ligante (VMTSC) 44
      3.3.2 Síntese do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] 45
4. **RESULTADOS E DISCUSSÂO** 46
   4.1 Ligante Tiossemicarbazona (VMTSC) 46
   4.2 Complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]Cl 48
   4.3 Análise Elementar 49
   4.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho 50
      4.4.1 Ligante (VMTSC) 50
      4.4.2 Complexo de fórmula [AgCl(VMTSC)PPh3] 52
   4.5 Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear 56
      4.5.1 Ligante (VMTSC) 56
      4.5.2 Complexo de fórmula [AgCl(VMTSC)PPh3] 65
   4.6 Estabilidade em solução 71
   4.7 Análise estrutural via difração de raios X por monocristal 72
   4.8 Avaliação da atividade antiproliferativa 74
   4.9 Ensaios preliminares de interação com o DNA 78
5. **CONCLUSÃO** 83
6. **REFERÊNCIAS** 85

7. **ANEXOS** 89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo genérico que abrange mais de 100 doenças diferentes, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células e pela migração de células anormais (malignas) para partes do corpo distante da origem. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores [1].

A origem do câncer esta relacionado a fatores genéticos e ambientais, sendo este último responsável por cerca de 80% a 90% de todos os cânceres. Os fatores ambientais referem-se aos diferentes agentes que podem ser encontrados nos ambientes em que os indivíduos interagem, como exemplo, agentes químicos provenientes do tabagismo, agentes físicos tal como a radiação e agentes biológicos como infecções. Tais agentes são denominados como cancerígenos ou carcinógenos [2].

O câncer surge a partir de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no DNA da célula. Há dois tipos de genes presentes em células normais que são responsáveis por codificar proteínas que regulam a divisão celular: proto-oncogenes (genes que promovem o crescimento celular) e genes supressores de tumor – anti-oncogenes (genes que inibem o crescimento celular). As alterações ocorrem nos genes proto-oncogenes, que quando ativados tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas[3] [4].

Carcinogênese ou oncogênese é o processo de formação do câncer e trata-se de um processo bastante complexo. Raramente uma única mutação em um único gene levará a formação do câncer, em geral, ela ocorre de forma lenta, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere-se e dê origem a um tumor visível, por isso a maioria dos cânceres se desenvolve na vida adulta [5].

Os tumores possuem duas classificações. Tumores benignos, que são neoplasia que crescem de forma organizada e delimitada, e não apresentando riscos de invadir outros tecidos. Normalmente tornam-se uma ameaça quando o volume da massa tumoral comprime órgãos e tecidos adjacentes, sendo necessário procedimento cirúrgico. O lipoma, o mioma e o adenoma são exemplos de tumores benignos. E tumores malignos, que em contra partida, são neoplasias que possuem um maior grau de autonomia e capacidade de migrar para regiões distantes de sua

origem, causando um tumor secundário, em um processo denominado metástase, comprometendo assim, a qualidade de vida do paciente[4].

1.2 Estatísticas

Desde 1995, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima e publica a incidência de câncer no Brasil, levando em conta os tipos específicos e desagregando os dados por estados e capitais. Para isso, é utilizada uma metodologia análoga ao da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (Iarc) e estimativas globais (Globocan), possibilitando uma estimativa trienal [6].

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, as estatísticas mundiais apontam que no ano de 2018 ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer o que levou a 9,6 milhões de óbitos, correspondendo a uma em cada seis mortes. Em 2020, o câncer foi responsável por quase 10 milhões de morte, sendo os mais comuns em ordem decrescente: mama, pulmão, colon e reto, próstata, pele e estomago, sendo o câncer de pulmão o mais letal. Claramente, o câncer representa uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo [7].

Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, devido à falta de acesso a diagnóstico e tratamento, além disso, pessoas provenientes desses países possuem uma maior probabilidade de desenvolverem câncer por meio de infecções crônicas. Infecções causadoras de câncer como hepatite e papilomavírus humano (HPV) contribuem com aproximadamente 30% dos casos de câncer nesses países [6] [7].

Contudo, é possível observar que há um crescente aumento de novos casos de câncer em todo o mundo, em parte pelo aumento da expectativa de vida. Verifica-se um declínio nos tipos de câncer característico nos países em desenvolvimento e um aumento daqueles associados à urbanização. O câncer de cólon e reto apresenta as maiores taxas ajustadas nos países com alto IDH; enquanto, nos países com baixo e médio IDH, o segundo mais incidente é o câncer do colo do útero [6].

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer de acordo com o Instituto Nacional de Cancêr (INCA). Os tipos de câncer mais frequentem em homens será próstata, cólon e reto, enquanto que nas mulheres os mais frequentes serão os cânceres de mama, cólon e reto, como demonstrado na **Figura 1** [6].

Figura 1: Estimativa do número de câncer por tipo de câncer no Brasil. **Fonte:** [6]

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	27.890	26,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	36.470	32,5%
Cólon e reto	12.480	11,6%			Cólon e reto	11.780	10,5%
Traqueia, brônquio e pulmão	7.900	7,4%			Glândula tireoide	7.740	6,9%
Estômago	6.100	5,7%			Traqueia, brônquio e pulmão	5.440	4,8%
Cavidade oral	5.930	5,5%			Colo do útero	5.400	4,8%
Bexiga	4.600	4,3%			Corpo do útero	3.360	3,0%
Esôfago	4.150	3,9%			Estômago	3.290	2,9%
Linfoma não Hodgkin	3.560	3,3%			Ovário	3.150	2,8%
Laringe	3.150	2,9%			Linfoma não Hodgkin	2.840	2,5%
Pele melanoma	2.530	2,4%			Pele melanoma	2.300	2,0%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

1.3 Tratamento

Existem três métodos principais convencionais no tratamento do câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Vale ressaltar que a abordagem múltipla do tratamento, associando diversas modalidades terapêuticas, costuma gerar melhores resultados em termos de cura, sobrevida e qualidade de vida [8].

A cirurgia oncológica é um tipo de tratamento do câncer que consiste na retirada do tumor através de operações no corpo do paciente, quando indicada, sua intenção é remover totalmente o tumor. Contudo, a cirurgia só é possível quando o câncer não entrou no processo de metástase, tornando o seu diagnóstico precoce essencial. Cerca de 50% dos tumores malignos antes do diagnostico já apresentam metástase [9].

A radioterapia é uma forma de tratamento local onde se utiliza radiação com o intuito de destruir o tecido doente e preservar, tanto quanto possível, as estruturas normais adjacentes. As fontes de energia empregadas na radioterapia são diversas, a radiação pode ser gerada a partir da energia elétrica, liberando raios X e elétrons, ou a partir de fontes de isótopo radioativo, que geram raios gama[10].

A quimioterapia tem como objetivo principal eliminar as células cancerígenas através de fármacos antineoplásicos. O tratamento quimioterápico do câncer é composto por fármacos com diferentes mecanismos de ação e estruturas. As principais classes de quimioterápicos incluem agentes alquilantes, análogos antimetabólicos do ácido fólico, das pirimidinas e das purinas, produtos naturais, hormônios e antagonistas hormonais e metalofármacos [11], sendo que este último vem impulsionando o desenvolvimento de novos fármacos desde a descoberta da

cisplatina (metalofármaco frequentemente citado como um grande sucesso da quimioterapia devido à pronunciada atividade contra diversas linhagens tumorais, particularmente em cânceres de testículo e de ovário) [9].

Como as células cancerígenas crescem muito mais rápido do que as células normais, os fármacos atuam, geralmente, na etapa da divisão celular. No entanto, devido à existência de algumas células normais que também possuem rápido crescimento, estas acabam tornando-se alvos deste tratamento, como os folículos capilares, o epitélio intestinal e células do sistema imunológico, contribuindo assim, para alguns dos efeitos colaterais da quimioterapia, sendo estes, queda de cabelo, ansiedade, náuseas, vômitos, anemia, fadiga e alterações renais e digestivas, contudo, tais efeitos vão variar de paciente para paciente, dependendo do fármaco indicado ao tratamento, da absorção e liberação do fármaco, da variabilidade genética do paciente, entre outros fatores.

Dessa forma, a baixa seletividade desses fármacos vem impulsionam o desenvolvimentos de novos metalofármacos que venham a dirimir tais efeitos colaterais, seja mais eficiente, e consequentemente, melhore a qualidade de vida dos pacientes. É importante ressaltar que medicamentos como antieméticos - fármacos para evitar a emese (vômito)- são utilizados como auxilio no tratamento, no combate aos efeitos colaterais e que grande parte desses efeitos é transitória, variam entre os pacientes e em função do tipo e da combinação de drogas utilizadas desaparecendo ao fim do tratamento [12].

Outro grande problema enfrentado no tratamento quimioterápico é o desenvolvimento de resistência pelos tumores aos agentes citotóxicos. A resistência resulta de uma variedade de alterações farmacocinéticas e moleculares que podem invadir os tratamentos mais bem planejados. Um dos meios de contornar essa situação é a combinação de fármacos no intuito de anular os efeitos de um mecanismo de resistência específico a um determinado agente[11]. Portanto, a busca por novos fármacos que superem a deficiência dos seus antecessores vem sendo constantemente impulsionado.

1.4 Complexos metálicos no tratamento do câncer

Os íons metálicos desempenham um importante papel nas funções de diferentes moléculas biológicas, podendo desempenhar um papel direto ou indireto em processos essenciais aos seres vivos. A maioria das moléculas biológicas, como

proteínas e DNAs, é rica em elétrons e sofre atração pelos cátions metálicos presentes nos fluidos biológicos, e dessa forma, os íons metálicos podem realizar uma variedade de funções, como o transporte de oxigênio desempenhado pela hemoglobina, proteína contendo ferro[13]. Em ácidos nucleicos, por exemplo, cátions metálicos são essenciais para neutralizar o grupo fosfato carregados negativamente. Eles desempenham um papel crucial na determinação da conformação e empacotamento de ácidos nucleicos [14].

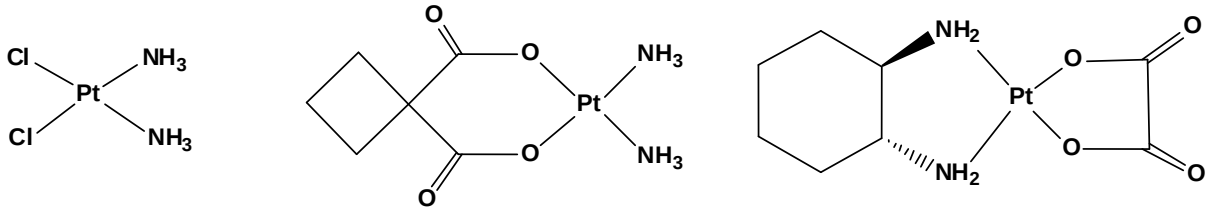
A química inorgânica medicinal explora as propriedades únicas desses íons metálicos no intuito do desenvolvimento de novos medicamentos. Isso, por exemplo, levou à aplicação clínica de agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer, como a cisplatina [15]. Contudo, a química inorgânica trata-se de uma área relativamente nova da química que oferece o potencial para concepção de novos agentes terapêuticos e de diagnósticos, e, portanto, para o tratamento e compreensão de doenças que atualmente são consideradas intratáveis[16].

A descoberta e desenvolvimento do composto antitumoral cisplatina (cis-[Pt $(NH_3)_2Cl_2$]) desempenhou um profundo papel no estabelecimento do campo da química inorgânica medicinal [17]. A capacidade desse complexo de inibir a divisão celular em bactérias do tipo *Escherichia Coli*, levou os primeiros estudos de atividade antitumoral em ratos e a sua avaliação como um dos fármacos mais eficientes para o uso contra diferentes tipos de câncer[18] [19].

Os complexos de coordenação de platina possuem uma ampla atividade antineoplásica e se tornaram a base do tratamento dos cânceres de ovário, cabeça e pescoço, bexiga, esôfago, pulmão e cólon. A cisplatina e a carboplatina (alternativa de segunda geração) ainda são os agentes quimioterápicos mais amplamente usados no tratamento do câncer, melhorando as taxas de sobrevivência de pacientes em todo o mundo [20].

Os complexos de platina usados clinicamente são mostrados na **Figura 2**. A cisplatina, assim como os demais complexos de platina alternativos, liga-se de forma covalente a sítios nucleofílicos do DNA, apesar de diferirem significativamente nas suas propriedades químicas, farmacocinéticas e toxicológicas. No interior da célula os ligantes cloretos são deslocados por moléculas de água, produzindo uma molécula de carga positiva altamente reativa sendo capaz de reagir com vários locais no DNA. O complexo platina-DNA altera a topologia do DNA, inibindo a replicação e a transcrição da molécula, resultando no processo de apoptose[11].

Figura 2: Estruturas de complexos de platina. **Fonte:** autor.



CISPLATINA **CARBOPLATINA** **OXALIPLATINA**

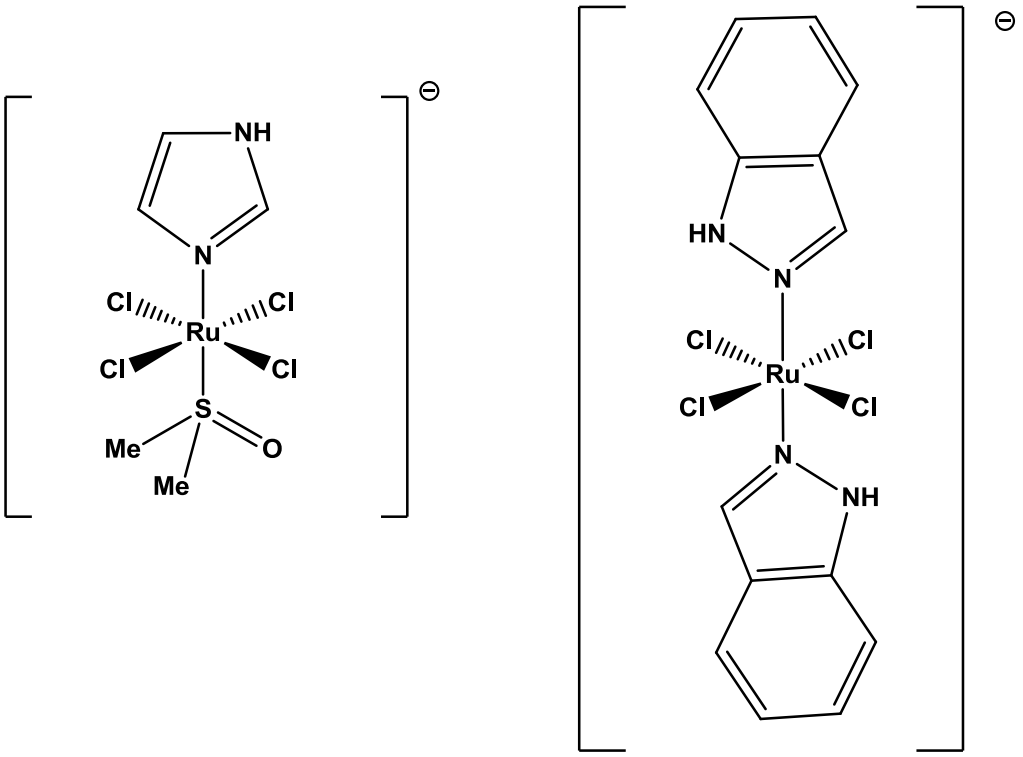
Embora a cisplatina esteja entre os agentes neoplásicos mais comumente usados no tratamento do câncer, algumas desvantagens são observadas. Devido à falta de especificidade do fármaco, os danos vão além dos tecidos tumorais, alcançando principalmente células saudáveis que apresentam como características rápida multiplicação, resultando nos indesejados efeitos colaterais. Os efeitos colaterais do fármaco incluem nefrotoxicidade, náusea, vômito e perda de sensibilidade. Além do mais, muitos tumores desenvolvem resistência à cisplatina após o primeiro curso do tratamento, impedindo sua readministração[21].

Neste contexto, a atividade antitumoral de uma grande variedade de complexos metálicos distinto dos de platina vem sendo investigada nas últimas décadas, buscando alternativas que superem a toxicidade, resistência e outras desvantagens desses compostos. Nesse cenário, complexos metálicos contendo diferentes tipos de centros metálicos (ex. Ru, Ti, Ga, Au, Pd, etc) vem sendo investigados e resultados muito promissores vem sendo obtidos. Complexos de rutênio, por exemplo, tem despertado interesse por apresentarem atividade antitumoral contra uma variedade de células tumorais e menor toxicidade em células não-tumorais, quando comparados aos complexos de platina.

O rutênio é particularmente atraente devido à cinética de troca de ligantes em seus complexos que se assemelha a dos complexos de cisplatina. Dois de seus agentes anticâncer a base de rutênio estão atualmente em ensaios clínicos, **Figura 3** [21]. O primeiro a entrar em ensaio clínico foi NAMI-A, que representa um potente agente contra tumores metastático, o complexo representa um importante passo no tratamento de metástases secundárias já que se trata de um grande desafio clínico. O segundo a entrar em ensaio clínico foi o KP1019, Apesar de sua estrutura semelhança ao NAMI-A, este agente possui atividade contra tumores primários. O

agente causa apoptose pela via mitocondrial e acredita-se que atue como um pró-fármaco com as espécies ativas reais ainda não identificadas.

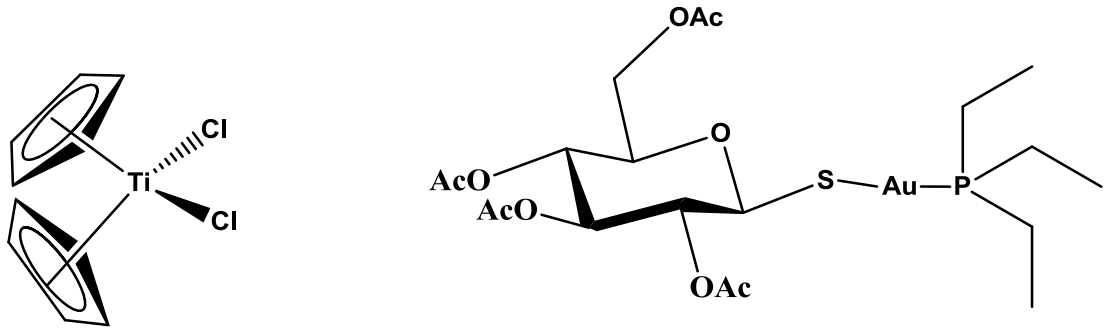
Figura 3: Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A (esquerda) e KP1019 (direita). **Fonte:** Autor



No impulso para criar metalofármacos que não se limitasse apenas a química do rutênio, uma série de derivados de ferroceno de tamoxifeno que surgiram dos laboratórios de Jaouen foram desenvolvidos. Os ferrocifenos são agentes em que um anel fenil de tamoxifeno é substituído por ferroceno. O tamoxifeno é uma droga orgânica que atua no receptor de estrogênio e tem um impacto muito significativo no tratamento do câncer de mama.

Na década de 1990, o agente organometálico dicloreto de titanoceno [Cp_2TiCl_2], **Figura 4**, entrou em ensaios clínicos como um agente anticâncer e, desde então, a atividade de alguns outros metalocenos (V, Nb, Mo, Fe, Ge, e Sn) vem sendo reportado [22]. O complexo é ativo contra uma ampla gama de carcinomas humanos, incluindo gastrointestinais e de mama carcinomas, mas não contra câncer de cabeça e pescoço.

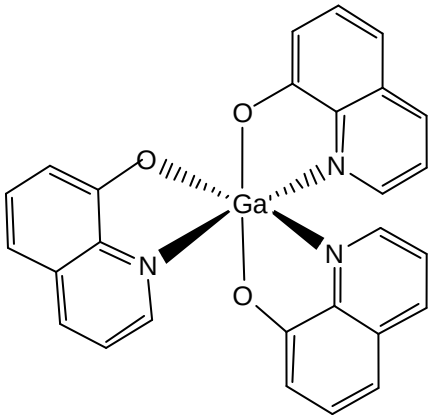
Figura 4: Estruturas dos complexos dicloreto de titanoceno (esquerda) e Aurofina (direita). **Fonte:** Autor.



Auranofina, complexo de ouro **Figura 4**, um medicamento anti-reumático aprovado pela Food and Drug Administration dos EUA, demonstrou ter propriedades anticancerígenas e encontra-se em ensaio clínico para tratar câncer epitelial de ovário recorrente [23]. O complexo tetraédricos de bis(difosfanil)ouro(I), exibe atividade em uma variedade de modelos de câncer, tendo mecanismo de ação diferente da cisplatina, ele é direcionado para as mitocôndrias onde perturba os potenciais de membrana, porém, o complexo provou ser cardiotóxico para uso clínico[16].

Os complexos de gálio são conhecidos por inibir o crescimento de tumor e o aumento interesse nesses compostos surge do efeito sinérgico nos sais de gálio com a cisplatina no tratamento de câncer de pulmão e carcinoma do urotélio[22]. A sua atividade, em grande parte, parece ser uma consequência da semelhança do gálio (III) com o ferro (III). O gálio interfere no transporte celular do ferro ligando-se à transferrina e também interfere na ação da ribonucleotídeo redutase, resultando na inibição da síntese de DNA[21]. O complexo KP46, tris(8-hidroxiquinolinato)gálio(III), em sua formulação oral (NKP2235) está sendo testado clinicamente, **Figura 5**.

Figura 5: Estrutura química do complexo KP46. **Fonte:** Autor.



Portanto, podemos perceber através de alguns complexos promissores o quanto a química inorgânica medicinal consegue impactar a farmacologia. O desenvolvimento de metalofármacos com potenciais atividades antitumorais vem revolucionando o tratamento do câncer nos últimos anos e grandes avanços, no mecanismo de ação, por exemplo, vem permitindo um desenvolvimento além dos simples compostos de platina para um amplo investimento na tabela periódica.

1.5 Prata

1.5.1 Compostos de prata(I)

Compostos de prata, na química medicinal, representam um campo bastante promissor a ser explorado devido às propriedades apresentada pelo íon prata. Sabe-se que, há muito tempo o íon de prata é eficaz contra uma ampla gama de micro-organismos. Por exemplo, soluções de nitrato de prata têm sido utilizadas em recém-nascido como prevenção a cegueira por infecções microbianas desde 1880 [19]. Hoje, os íons de prata são usados para controlar o crescimento bacteriano em uma variedade de aplicações médicas, incluindo tratamento odontológico, cateteres e cicatrização de queimaduras [24].

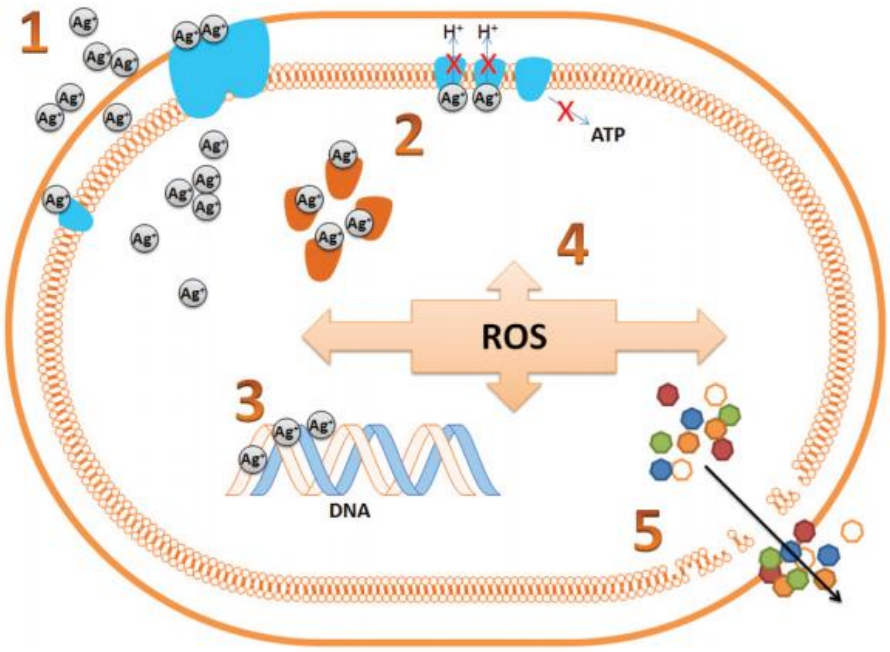
Apesar da prata não ter nenhum papel biológico conhecido no corpo humano, o íon prata pode ser absorvido através da pele, pulmões, mucosa e trato gastrointestinal, podendo estar presente no corpo humano em concentrações baixas (<2,3 μg / L) sem que haja efeitos tóxicos, provavelmente devido a formação de AgCl. Dessa forma, sua baixa toxicidade ao ser humano representa uma vantagem no desenvolvimento de novas drogas metaloterapeuticas [25] [26].

A atividade antifúngica dos íons de prata é confirmada pela literatura, mas sua toxidade em células bacteriana é bem maior quando comparada com as dos fungos. Íons Ag^+ têm sido uma das drogas antibacterianas mais importantes antes do advento da era dos antibióticos. Os íons de prata podem interagir com muitos grupos de proteínas, tendo como alvo: proteínas com resíduos em cisteína e metionina, e aminoácidos que contem enxofre.

Apesar de ainda não ser totalmente compreendido o mecanismo de ação da prata, a interação do Ag^+ com a célula bacteriana se dá fora e dentro da célula. Acredita-se que Ag^+ pode se ligar com eficiência às proteínas da membrana celular causando danos que possibilita o vazamento de íons potássio que causa sua morte. Além disso, o íon interfere no crescimento celular por inibição das funções de

transporte na parede celular levando a desestabilização e bloqueio dos processos de síntese de ATP (respiração). Quando o Ag^+ entra na célula há Interrupção do metabolismo celular, devido à interação com peptídeos e proteínas, especialmente com grupos tióis, levando a inativação de enzimas e desnaturação de proteínas, e inibição da divisão celular, por meio de interação com ácidos nucleicos, particularmente com as bases do DNA interrompendo os processos de replicação celular [27]. Além de induzir a produção de ROS (espécie reativa oxigenada) que causam dano ao DNA, **Figura 6**.

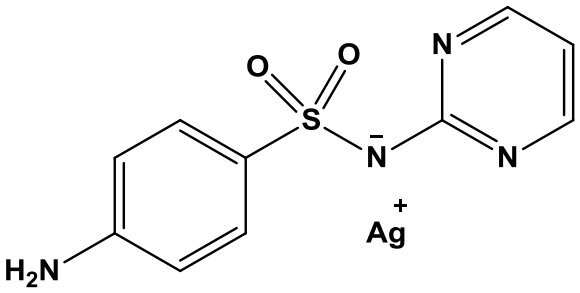
Figura 6: Esquema representativo do mecaismo de ação dos íons Ag+. **Fonte:** Adaptado de [27].



Dessa forma, a eficácia dos múltiplos mecanismos de ação da prata em baixas concentrações a torna única, para atividades celulares, pois, reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência do organismo, o que é comum ocorrer com antibióticos clássicos. Logo, a espécie biologicamente ativa, o íon prata, se torna bastante atrativa no desenvolvimento de metalofarmaco.

O complexo de Sulfadiazina de Prata(I), **Figura 7**, por exemplo, trata-se de um potente bactericida, que foi sintetizado por Fox, o qual estabeleceu sua eficácia para a prevenção e tratamento de infecções por queimadura, hoje é um medicamento tópico para o tratamento de queimaduras e úlceras varicosas, por proporcionar cicatrização rápida [28].

Figura 7: Estutura química do Sulfadiazina de Prata(I). **Fonte:** Autor.



Apesar de, historicamente, os complexos de prata ser estudados amplamente quanto a sua atividade antimicrobiana, trabalhos referentes à atividade antitumoral são menos numerosos em comparação a outros complexos metálicos [29]. No entanto, a atividade antitumoral dos complexos de prata tem recebido atenção de vários pesquisadores nos últimos tempos. Na literatura, complexos de prata de interesse biológico são relatados contendo diferentes tipos de átomos doadores, como nitrogênio, fósforo, enxofre e oxigênio; apresentando ação antitumoral contra uma variedade de linhagens de células cancerígenas [26].

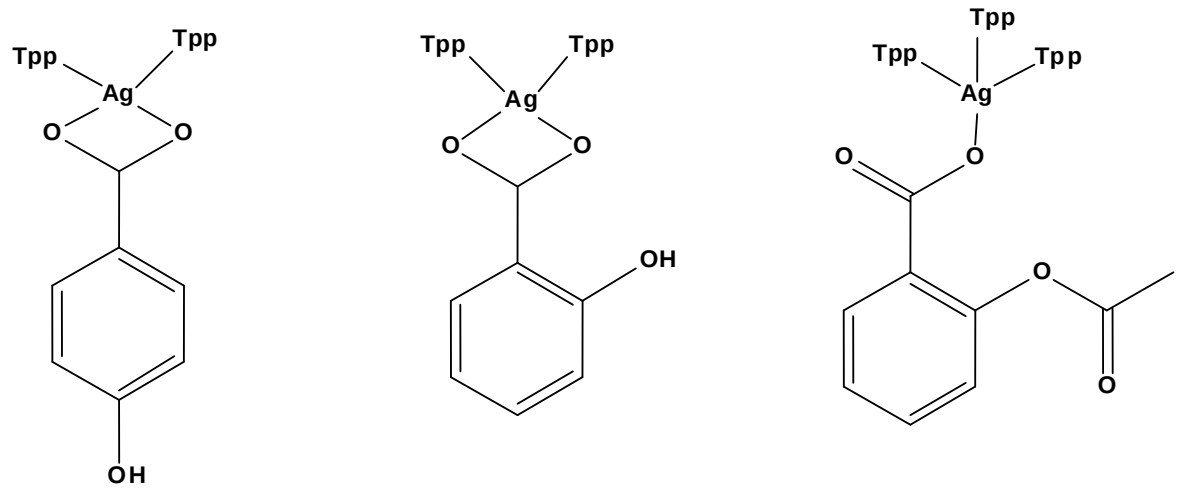
Para que um complexo bioativo cumpra com sua missão terapêutica é necessário que ele alcance seu alvo biológico dentro da célula. Para complexos de prata isso se torna um desafio devido a forte interação que os íons prata exercem com componentes celulares que podem reduzir os íons prata biodisponíveis. Por exemplo, a presença de ânions como o cloreto em baixas concentrações pode precipitar os íons prata da solução como AgCl. Contudo, uma maior concentração do cloreto leva a formação de um complexo solúvel, $[AgCl_2]^-$, revertendo a precipitação [26]. Uma estratégia bem conhecida para controlar tal situação é a utilização de ligantes quelantes, e assim, aumentar a estabilidade do complexo formado reduzindo a velocidade de reação. Em geral, a labilidade de um complexo não depende somente da identidade do metal, mas do composto como um todo. Logo, a escolha dos ligantes é fundamental para controlar a cinética de troca de ligantes dos compostos de prata.

O íon prata pode adotar uma variedade de número de coordenação levando a diversas geometrias de coordenação, como linear, trigonal ou tetraédrica. A flexibilidade relativa da esfera da coordenação do íon prata pode ser explicada pela falta de direcionamento estereoquímica que surge de sua configuração eletrônica d^{10} [26].

íons Ag^+ são classificados como um ácido de Pearson macio e como tal, tendem a coordenar de forma mais eficiente com ligantes macio a intermediário[30]. Portanto, complexos de prata para fins terapêuticos são relatados com uma grande variedade de ligantes, sendo os que apresentam melhores resultados são os que contêm em sua estrutura ligantes N-heterocíclicos (fenantrolinas, piridinas e polipiridinas, etc.), N-heterocíclicos carbenos (NHC), e fosfinas. Uma abordagem bastante popular para obtenção de complexos bioativo é a utilização de ligantes com propriedades biológicas para um aproveitamento sinérgico entre as partes do complexo, como no composto Sulfadiazina de Prata(I).

Diante desta perspectiva, Banti e seu grupo de pesquisa sintetizaram e avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* de complexos de prata(I) do tipo $[Ag(Tpp)_nL]$, onde Tpp= trifenilfosfina e L= ácido 4–hidroxibenzóico (L_1), ácido salicílico (L_2), ou ácido acetilsalicílico (aspirina) (L_3), **Figura 8**. Logo, Banti propôs um efeito sinérgico entre as propriedades da prata e dos ligantes que são tidos como drogas anti-inflamtórias não esteroides (AINES). Os compostos foram testados frente às linhagens celulares de leiomiossarcoma (LMS) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Todos os compostos se mostraram mais ativos que os ligantes livres contra as linhagens testadas e mais ativo que o fármaco cisplatina [31] [32].

Figura 8: Estrutura de complexos de prata(I) sintetizados por Banti et al. **Fonte:** autor.



$[Ag(Tpp)_2L_1]$ **$[Ag(Tpp)_2L_2]$** **$[Ag(Tpp)_3L_3]$**

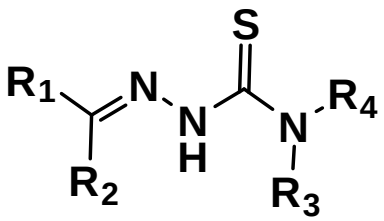
Complexos Ag(I) bioativos frequentemente exibem suas propriedades biológicas mais elevadas em comparação com seus ligantes livres, geralmente, devido a combinação das propriedades de ambas as partes que compõe o complexo, resultando em uma resposta mais apreciável. Isso demonstra que os íons de prata têm uma função importante na destruição das células cancerosas. Logo, com baixa toxicidade em humanos, e diante do que foi exposto, a prata fornece um ótimo ponto de partida no desenvolvimento de metalofármaco, e dentre os ligantes conhecidos usados para tal propósito, temos como destaque as tiossemicarbazonas.

1.6 Tiossemicarbazonas

1.6.1 Aspectos químicos

As Tiossemicarbazonas constituem uma importante classe de ligantes N, S doadores, tendo sua química de coordenação inicialmente explorada durante o início dos anos 60. [33] [34]. Consideradas como compostos imínicos, as tiossemicarbazonas são basicamente bases de schiff, que podem formar diversos derivados apenas envolvendo a substituição dos grupos R1 a R4 em sua estrutura geral **Figura 9**.

Figura 9: Estrutura geral das tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

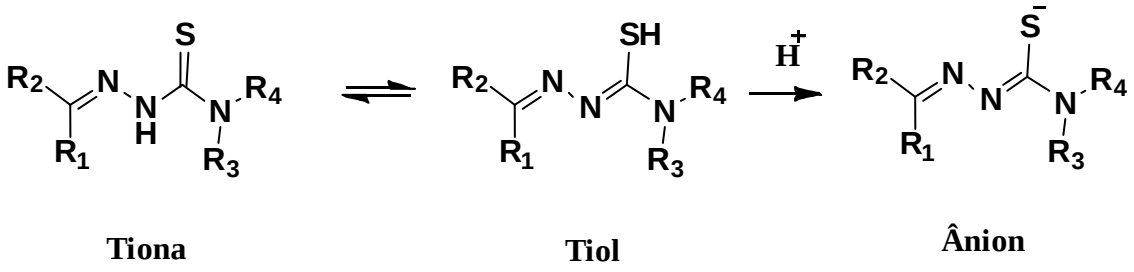


A síntese de tiossemicarbazonas foi extensamente explorada e descrita na literatura, o método convencional consiste basicamente em um processo de condensação de uma cetona ou um aldeído a uma tiossemicarbazida, utilizando como condições reacionais aquecimento via refluxo e catálise ácida.

Como em sua estrutura há átomos doadores de elétrons N, S, as tiossemicarbazonas são ligantes que apresentam uma variedade de modos de coordenação, podendo se coordenar a centros metálicos de diversas formas, dependendo do aldeído ou cetona utilizada em sua síntese.

A exclusiva diversidade estrutural das TSC permite que exista como tautômeros tiona–tiol em solução, podendo ligar-se a centros metálicos através de forma neutra ou ainda aniônica, **Figura 10.** Contudo, elas existem predominantemente em sua forma tiona no estado sólido [35]. A forma aniônica é gerada após a perda do íon hidrogênio, podendo ocorrer tanto com o hidrogênio localizado no enxofre como com o hidrogênio pertencente ao nitrogênio.

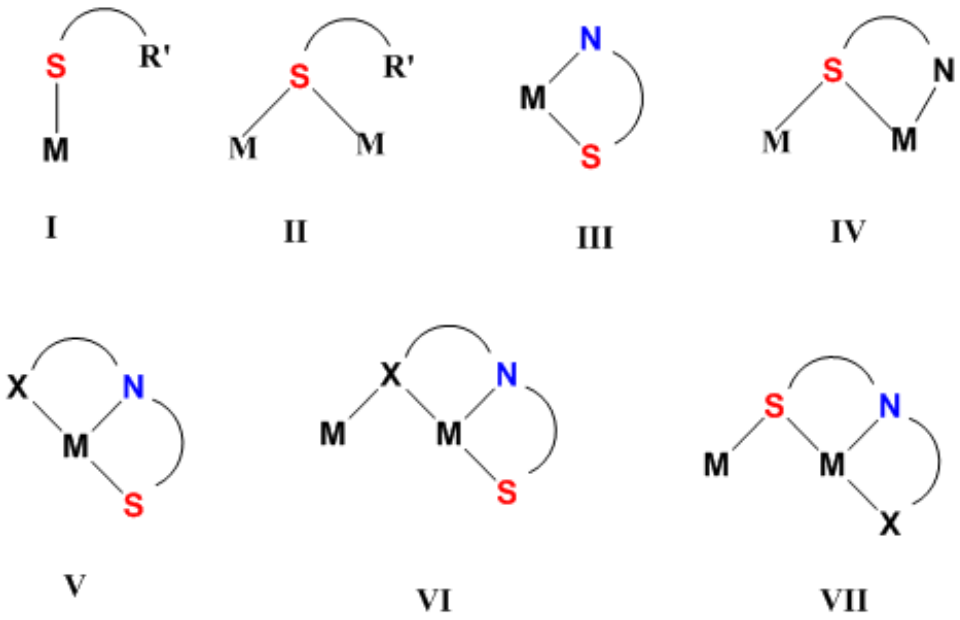
Figura 10: Tiossemicarbazonas em suas formas neutra (tiona-tiol) e aniônica. **Fonte:** Autor.



Dessa forma, é possível observar vários modos de coordenação das TSC aos centros metálicos, tanto em sua forma neutra como em sua forma aniônica **Figura 11**. Na forma neutra, os modos de ligações podem ocorrer através unicamente do átomo de enxofre (I), como ponte (II) e quelatos (III e IV). No entanto, dependendo do substituinte presente na estrutura da tiossemicarbazona é possível que ocorra os modos mais diversificados de ligação, como em (V), (VI) e (VII), sendo X um átomo doador de elétrons proveniente de um substituinte da estrutura.

A Forma aniônica apresenta os mesmos modos de coordenação da forma neutra, porém, existe exemplos raros, por exemplo, de pentacoordenação relatadas para ligante TSC.

Figura 11: Formas de coordenação para tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

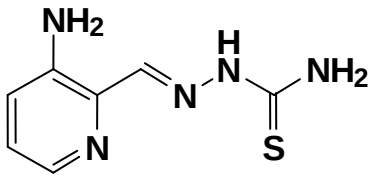


1.6.2 Atividade biológica

Tiossemicarbazonas são compostos dotados de uma grande variedade de propriedades biológicas. Entre as atividades apresentadas por esta classe podemos citar: antiviral [36] [37], antibacteriana [38], antiprotozoária, citotóxica, antitumoral, entre outras [39]. Atualmente, uma das grandes preocupações dos pesquisadores, além de desenvolver novos complexos, é aumentar a atividade antitumoral e antiprotozoária destes ligantes.

As propriedades medicinais das TSC têm como um dos principais representantes a triapina (3-Aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona), **Figura 12**, que é o mais proeminente da família de compostos α-N-heterocíclicos tiosemicarbazona. A triapina tem mostrado resultados promissores em ensaios clínicos e está atualmente avaliado na fase III, onde está sendo testada a combinação da triapina com a cisplatina no tratamento do câncer cervical e vaginal em estágio avançado [40] [41].

Figura 12: Estrutura linear da tiossemicarbazona Triapina. **Fonte:** Autor.

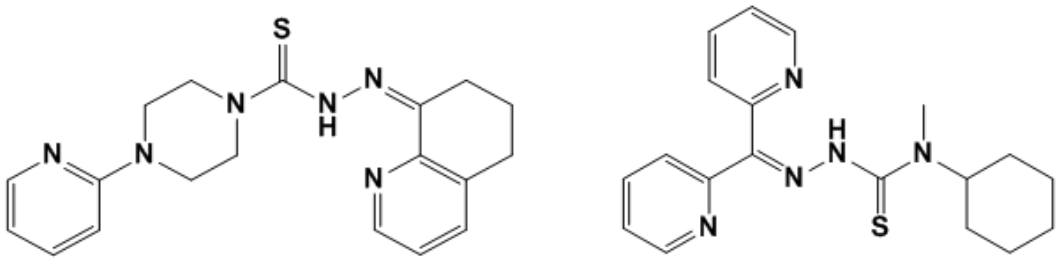


Como alvo biológico, a triapina atua via inibição da ribonucleotídeo redutase (RR), uma enzima que contém ferro, responsável pela redução dos ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, que são os blocos de construção do DNA, tornando-se assim, um importante alvo na terapia do câncer [42] [43, 44] [44]. Dessa forma, os inibidores desta enzima são extremamente efetivos em bloquear a biossíntese de DNA, resultando em apoptose celular.

As tiossemicarbazonas são os inibidores mais fortes conhecidos desta enzima, sendo várias ordens de magnitude mais eficientes do que a hidroxiureia , o primeiro inibidor de RR clinicamente aprovado [45] [44]. Indícios bastante convincentes mostram que o mecanismo de ação da Triapina está fortemente relacionado à sua capacidade de formar complexos de ferro altamente estáveis [40].

TSCs também possui como alvo terapêutico, a topoisomerase II (Top2) [46], enzima responsável por clivar o DNA para remover nós e emaranhados que ocorrem naturalmente [47], estando assim, envolvida na replicação, transcrição, recombinação, condensação cromossômica, sendo altamente expressa em muitos tumores [48]. As TSCs também podem induzir a geração de espécies reativas de oxigênio que induzem lesão celular, incluindo oxidação do DNA e dano mitocondrial[49], podem agir nos mutantes do gene p53 que é uma proteína supressora de tumor chave que tem uma ampla gama de funções incluindo a capacidade de promover apoptose, senescência e reparo de DNA; cada uma das quais ajuda a prevenir o desenvolvimento do câncer [50].

Figura 13: Estrutura química da tiossemicarbazona COTI-2 (esquerda) e DpD (direita). **Fonte:** Autor.



Recentemente, outras duas TSCs a 4-(2-piridinil)-2-(6,7-di-hidro-8(5H)-quinolinilideno)hidrazida (COTI-2), e di-2-piridilcetona-4-ciclohexil-4-metil-3-TSC (DpC) entraram em estudos clínicos **Figura 13**. A COTI-2 exibe atividade antimural contra múltiplos cânceres, *in vitro* e *in vivo,* e sua atividade é associada à ativação da funcionalidade do gene p53 mutado [51] [52]. O DpC é um análogo da segunda geração do di-2-piridilcetona 4,4-dimetil-3-tiosemicarbazona (Dp44mT) que encontra-se em ensaio clínico no tratamento de tumores avançados e resistentes gerando estresse oxidativo nas células cancerosas, o que induz a permeabilização da membrana lisossomal resultando no processo apoptótico e autofágico [53]. Estrutura química da tiossemicarbazona COTI-2 (esquerda) e DpD (direita). Fonte: Autor.

Portanto, tiossemicarbazonas vem possibilitando novos caminhos para o desenvolvimento de medicamentos quimioterápicos. Sendo assim, bastante perceptível o interesse de pesquisas nessa classe de compostos.

1.6.3 Complexos metálicos

Os complexos metálicos envolvendo as tiossemicarbazonas apresentam uma variedade de propriedade farmacológica. Na literatura é observado que a atividade biológica de complexos metálicos em comparação com o seus respectivos ligantes tiossemicarbazonas é aumentada devido à coordenação ao íon metálico. Isso ocorre porque os complexos, por vezes, conseguem oferecer vias de transporte mais ativo para dentro da célula, permitindo assim, um acúmulo celular maior e um efeito mais

seletivo [46]. Em geral, esses complexos metálicos podem ter mecanismos de ação duplos ou mesmo múltiplos, combinando as propriedades farmacológicas do ligante e do metal, resultando em um efeito sinérgico ou aditivo e em uma melhora da biodisponibilidade do ligante com a formação do complexo [54] [55].

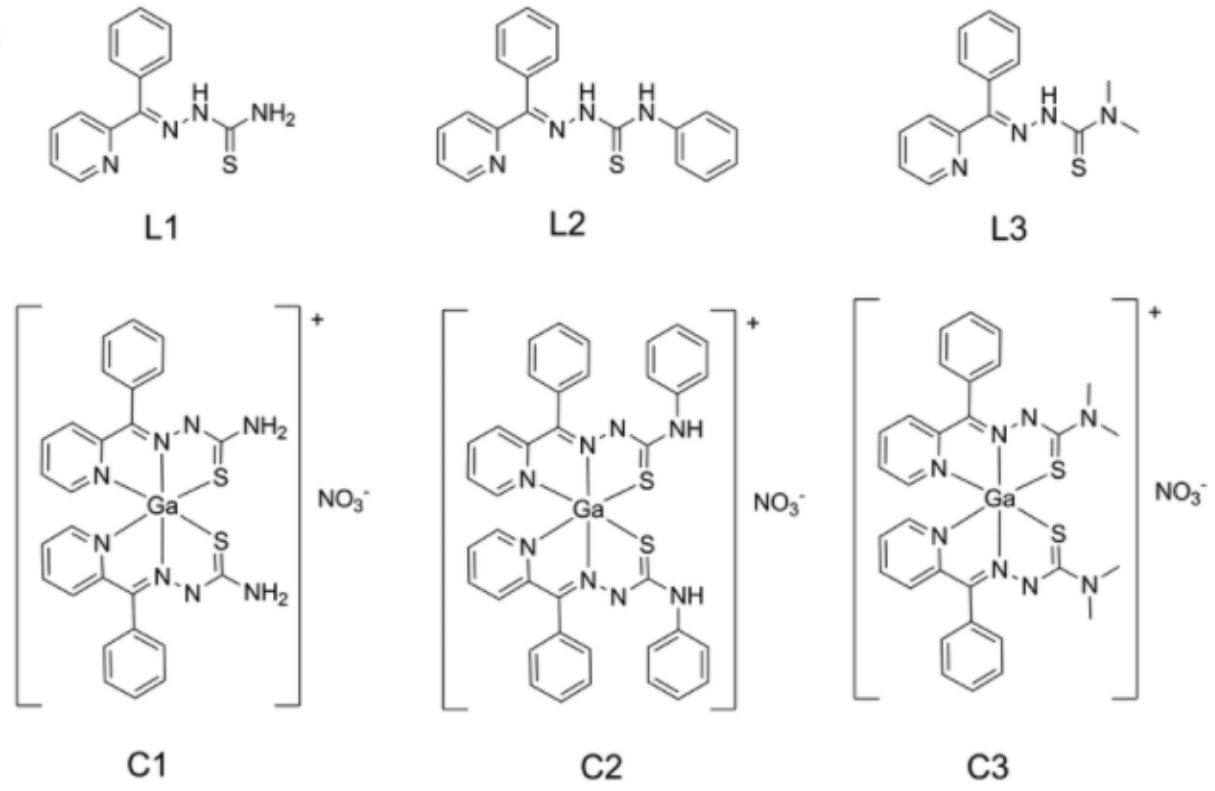
Logo, devido ao extenso estudo referente às TSCs é possível encontrar complexos desses ligantes coordenados a diversos metais de transições, **Tabela 1**. Evidenciando o potencial dessa classe de ligante bioativo. Na literatura há mais complexos frequentemente relatados com metais Ru, Co, Ni, Pt, Cu, Zn, Hg e Sn; enquanto que os metais Cr, W, Tc, Rh, Ag, Al, Ga, In e Bi são os mais escassos, [56].

Tabela 1: Metais por grupo que apresentam complexos de tiossemicarbazonas. **Fonte:** [54]

5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
								Al		
V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga		
	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	
	W	Re			Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi
U										

Neste contexto, Jinxu e colaboradores sintetizaram e avaliaram a ação antitumoral de complexos de tiossemicarbazonas com gálio(III), **Figura 14**, os quais demonstraram ser significativamente maiores do que as de seus correspondentes ligantes tiossemicarbazonas. Os complexos foram testados frente às linhagens celulares NCI-H460, BEL-7402, T24 e MRC-5, e em todas elas pode-se perceber melhores valores de IC_{50} quando comparado com os ligantes. Para a Linhagem NCL-H460, por exemplo, o ligante L1 apresentou IC_{50} de 17,54 ± 2,2 μM e seu complexo 4,89 ± 0,34 μM, representando uma melhora de aproximadamente 28% [57].

Figura 14: Estruturas químicas de ligantes tiossemicarbazonas L1, L2 e L3, e seus respectivos complexos de gálio(III), C1, C2 e C3. **Fonte:** [55]



1.7 Ligantes fosfínicos no desenvolvimento de complexos bioativos

A química das fosfinas e seus complexos metálicos despertam bastante interesse devido sua ampla aplicação. As fosfinas podem atuar tanto no controle de pragas em grãos como fumegante, assim como efetivos e eficientes catalisadores, ou até mesmo no uso clínico através de medicamentos como Auronofina, complexo fosfínico de Au(I), medicamento utilizado no tratamento de artrite reumática, o qual também mostrou possuir atividade antitumoral [58] [59].

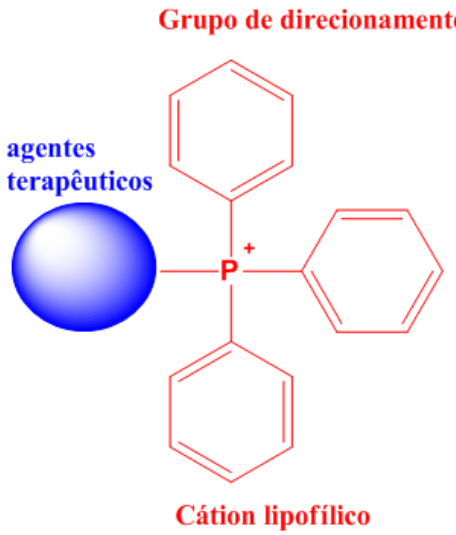
As fosfinas terciárias, PR_3, estão entre os ligantes mais comumente encontrados em complexos de metais de transição. Existem exemplos desses ligantes em complexos com praticamente todos os metais de transição, isso reflete a versatilidade eletrônica das fosfinas. Elas formam complexos cineticamente estáveis com metais que apresentam tanto estado de oxidação alto quanto estado de oxidação baixo [59] [60].

Alterações dos substituintes em fosfinas terciárias podem causar mudanças substanciais na reatividade dos complexos de metal de transição, podendo contribuir, Por exemplo, para uma maior solubilidade. Logo, conhecer os fatores que influenciam a reatividade em um sistema possibilita uma projeção racional de complexos fosfinicos como agentes quimioterápicos [59].

A auranofina, complexo fosfínico de ouro, deu entrada na indústria farmacêutica como metalofármaco para o tratamento de artrite desde 1985, apresentando atividade antitumoral com bioatividade próxima a da cisplatina. Em geral, estudos de mecanismo de morte celular indicam que a auranofina possui como alvo biológico principal a enzima tiorredoxina redutase (TrxR) [60] [61]. Desde então, vários complexos fosfínicos de ouro também foram testados como agentes antitumorais. Isso levou à descoberta de outras fosfinas com atividade anticâncer de amplo espectro, com mecanismo de ação indicando que esses compostos induzem a apoptose através de danos a mitocôndria e inibição da enzima redutases.

Dentre as fosfinas, o cátion trifenilfosfônio (TPP),**Figura 15**, cátion lipofílico mais bem caracterizado e mais amplamente utilizado para guiar a distribuição de espécies na mitocôndria, usado originalmente para avaliar o potencial da membrana mitocondrial, por exemplo, faz parte de uma classe de moléculas tida como direcionadora mitocondrial, conhecida como cátions lipofílicos deslocalizados (CLD)[62].

Figura 15: Estrutura do cátion trifenilfosfónio. **Fonte:** autor.



Os cátions lipofílicos que possuem uma carga positiva deslocalizada penetram nas barreiras hidrofóbicas do plasma e das membranas mitocondriais e se acumulam nas mitocôndrias em resposta aos potenciais transmembranares negativos dentro [63] [64]. Estima-se que o cátion TPP acumula-se em concentrações 5 a 10 vezes maiores no citoplasma quando comparado com o ambiente extracelular, e em concentrações centenas de vezes maiores na mitocôndria quando comparado com o citoplasma[62].

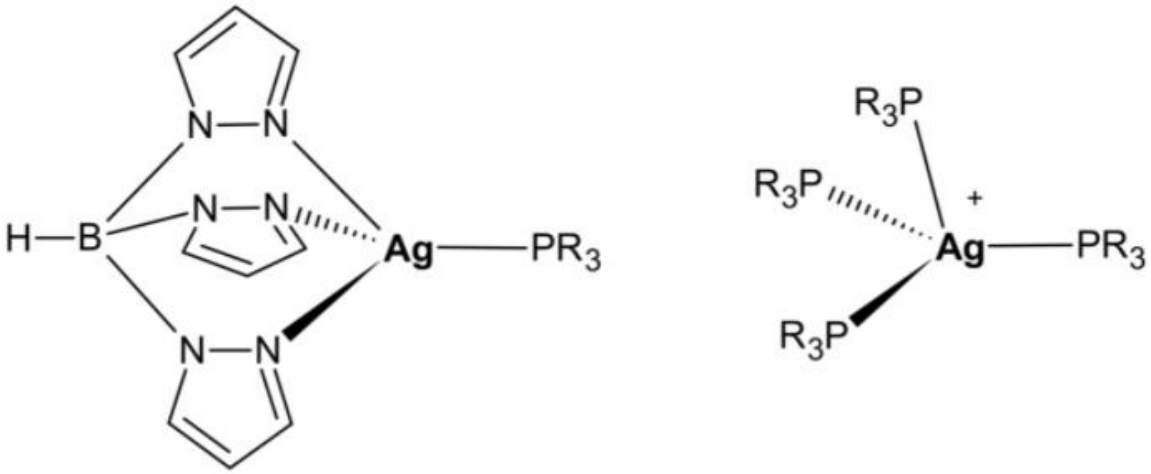
Independentemente do mecanismo específico de toxicidade mitocondrial, o acúmulo de DLCs em concentrações suficientemente altas na mitocôndria resulta em uma diminuição significativa na produção de ATP celular. O potencial aumentado da membrana mitocondrial em células de carcinoma, que leva ao acúmulo seletivo de DLCs e consequente toxicidade mitocondrial, o que acarreta no processo de apoptose celular [64].

As propriedades do cátion TPP têm ajudado a direcionar uma série de agentes terapêuticos para a mitocôndria, incluindo antioxidadantes, agentes anticacerígenos, peptidos, ácidos nucleicos, e fotossensibilizadores no caso de terapia fotodinâmica [65] [66] .

Vários estudos demonstram o potencial de complexos de prata contendo ligantes fosfinicos em causar efeitos significativos nas mitocôndrias. O grupo de pesquisa de Banti *et. al.* (2012) demonstraram que complexos fosfínico de prata(I) e ácido benzoicos inibem a enzima Lipoxigenase (LOX) causando apoptose. A enzima LOX catalisa a oxidação de ácido araquidônico a leucotrienos, um mecanismo essencial para a vida da célula e é distribuído principalmente nas mitocôndrias [31].

Recentemente, Khouloud Dammak *et. al.* (2020) investigaram a atividade antitumoral de uma série de complexos de Prata(I) contendo ligantes fosfínicos contra um amplo painel de células cancerígenas humanas derivado de tumores sólidos. Dentre os complexos testados, os que obtiveram melhores valores de IC_{50} foram os complexos que tinha em sua estrutura o ligante trifenilfosfina, sendo a maior citotoxicidade associada à lipofilicidade desse ligante. Os complexos mais ativos são $[HB(pz)_3]Ag(PPh_3)$, $[HB(pz)_3]^-$ = ânion tris(pirazolil)borato com IC_{50} no intervalo 1,52–4,44 μM e $[Ag(PPh_3)_4]BF_4$, com IC_{50} no intervalo 1,98–5,12 μM, **Figura 16**. Estudos apontam como alvo molecular a enzima TrxR para as várias classes de compostos de prata(I) e, apenas para os complexos da **Figura 16**, um colapso do potencial da membrana mitocondrial, bem como à perda de sua forma e integridade [67].

Figura 16: Estrutura dos complexos $[HB(pz)_3]Ag(PPh_3)$ e $[Ag(PPh_3)_4]BF_4$, respectivamente. **Fonte:** autor.

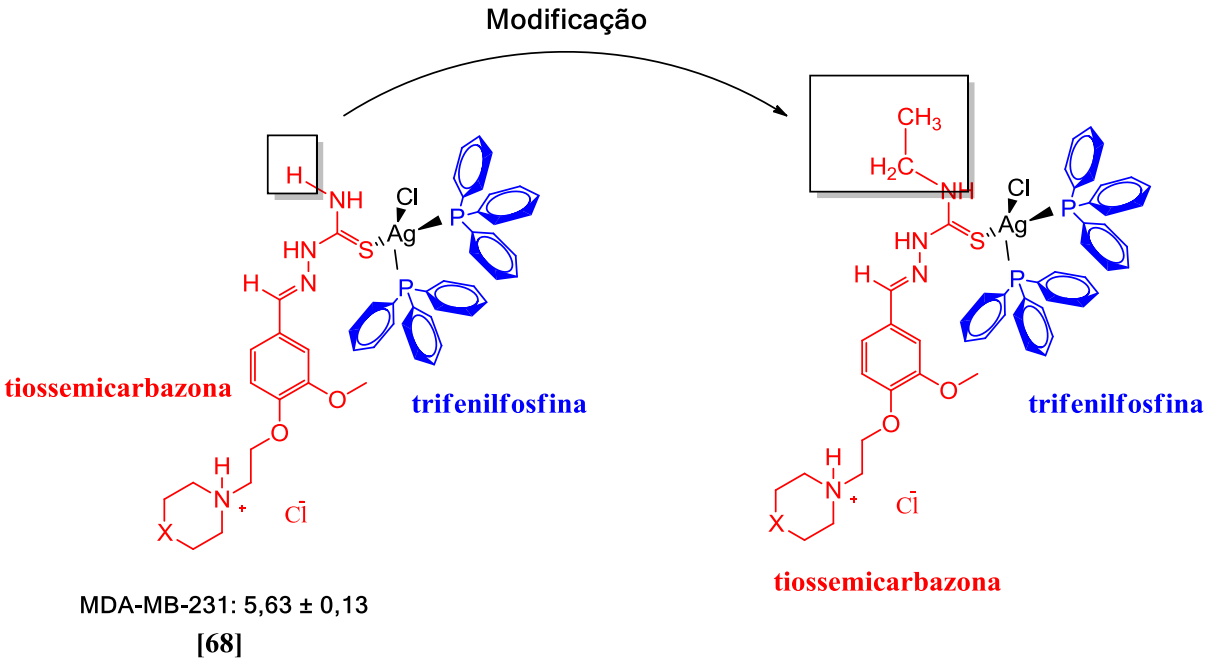


1.8 Hipótese do trabalho

Visto a atividade inibitória dos complexos de prata(I) reportada na literatura, a baixa citotoxicidade do íon prata ao ser humano, nosso grupo tem se dedicado na síntese de complexos de prata(I) contendo trifenilfosfina e tiossemicarbazonas derivados da vanilina [68]. Resultados bastante promissores foram obtidos frente á variadas células tumorais. Recentemente, o composto de formula $[AgCl(PPh_3)_2(VTSC)]$, mostrou ser promissor perante células tumorais de mama triplo negativo (MDA-MB-231) apresentando um IC_{50} de 5,63 ± 0,13 μM. O câncer de mama é o câncer mais comumente diagnosticado (um em cada quatro casos de câncer) e a principal causa de mortes relacionadas ao câncer em mulheres, sendo que o câncer de mama triplo negativo contém uma característica taxa de recorrência e mortalidade mais alta do que outros subtipo de câncer de mama, se tornando um câncer de alto risco, portanto, um desafio terapêutico [69] [70].

Portanto, diante da significativa atividade do composto $[AgCl(PPh_3)_2(VTSC)]$, propõem-se um estudo sintético/estrutural e investigativo da ação antitumoral do complexo proveniente da substituição do átomo –H presente na tiossemicarbazona pelo grupo –etil, **Esquema 1**. Espera-se que, com essa substituição melhores resultados possam ser obtidos do efeito citotóxico contra a linhagem MDA-MB-231, entre outras.

Esquema 1: Esquema de modificação estrutural baseado em molécula protótipo. **Fonte:** Autor.



A inserção do ligante PPh_3 tem por objetivo aumentar a lipofilicidade dos complexos, o que leva ao aumento na sua citotoxicidade, contudo, também torna o complexo menos solúvel no meio biológico. Neste contexto, pensando em termos farmacológicos, que a tiossemicarbazona derivadas da vanilina O-funcionalizada com N-etilmorfolina é utilizada para compor a estrutura do complexo, visando à melhora da solubilidade, já que a tiossemicarbazona em questão trata-se de um ligante solúvel em meio aquoso bastante promissor. Essa estratégia foi utilizada buscando um efeito sinérgico entre as porções do complexo, a fim de obter um composto mais ativo que suas frações livres.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a síntese, caracterização e estudo do potencial antitumoral do complexo de prata(I) contendo ligantes mistos, tiossemicarbazona derivado da vanilna funcionalizada com eitlmorflina e trifenilfosfinas.

2.2 Objetivo específicos

- Sintetizar e caracterizar os ligantes de tiossemicarbazonas derivados de vanilina funcionalizada com etilmorfolina (VMTSC).
- Sintetizar e caracterizar o complexo inédito de prata(I) de fórmula geral $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]Cl$, onde; VMTSC= tiossemicarbazona e PPh_3= Trifenilfosfina.
- Avaliar a estabilidade química do complexo em solução.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do complexo frente às células tumorais;
- Investigar a interação do complexo com CT-DNA por técnicas espectroscópicas, dentre elas, o dicroísmo circular (CD) e a titulação por UV-vis.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os reagentes 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (vanilina), cloridrato de 1-(2-cloroetil)morfolina, 4-etil-3-tiossemicarbazida, nitrato de prata, NaCl e trifenilfosfina (PPh_3) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados como fornecidos, assim como os solventes orgânicos.

3.2 Instrumentação

Análise elementar (CHN)

A análise elementar (CHN) foi feita em um Analisador Elementar – Perkin Elmer 2400 série II (Central Analítica da Universidade de São Paulo). Foram utilizados como compostos de referência EDTA, cisteína e acetaldeído de acordo com a porcentagem de carbono proposta.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum 200, na faixa de 4000-400 cm^{-1}, utilizando o método de pastilhas de KBr.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em um espectrômetro BRUKER multidisciplinar do Instituto de Química Campus de Araraquara, modelo Avance III HD 600, operando em 600 MHz (14,1 T) a 298 k com sonda criogênica. Os espectros de RMN de ^{31}P foram obtidos em um espectrômetro BRUKER Avance III HD 600, operando em 600 MHz (14,1 T) a 298 k com sonda multinuclear de 5 mm que conta com uma unidade de controle de temperatura (BCU I).

Estabilidade dos compostos em solução

Considerando os posteriores ensaios biológicos, a estabilidade dos compostos em solução foi avaliada pela técnica de RMN ^{1}H e ^{31}P. As amostras foram solubilizadas em DMSO-d_6 e os espectros foram coletados em um espectrômetro

BRUKER multinuclear, modelo Avancer III HD 600, operando em 600 MHz (14, 1T) a 298 K nos tempos de 0, 24 e 28 h.

Titulação espectrométrica por UV-vis do DNA

Foi preparada uma solução estoque de CT-DNA em tampão Tris-HCl (5mL Tris HCl e 50 µM de NaCl, pH7,4) e a pureza do DNA foi avaliada pela razão entre as bandas de absorção em 260 e 280 nm (os valores na faixa1,8-1,9 condizem com uma solução de DNA livre de proteína). A concentração da solução de DNA foi determinada pelo coeficiente de absortividade molar na banda de 260 nm (Ɛ=6600 L/mol.com) [71].

As titulações foram feitas utilizando cubetas de quartzo de 3,5 mL contendo solução tampão Tris-HCl/2% DMSO e solução dos compostos fixadas em 1mM à 25 ºC. Assim, os espectros de UV-vis foram obtidos com a adição de quantidades crescentes de CT-DNA na faixa de 0-60 µM.

A constante de ligação K_b foi obtida pela equação de Benesi-Hildebrand (Eq.1). Nesta equação, A e A_0 representam as absorções das soluções dos compostos na presença e na ausência de CT-DNA, respectivamente. Assim como, os coeficientes $Ɛ_G$ e $Ɛ_{H-G}$ se referem aos coeficientes de absortividade molar do composto livre e na presença do DNA. A constante Kb foi calculada pela relação entre os coeficientes linear e angular obtidos da curva de $A_0/(A- A_0)$ por 1/[DNA].

$$\frac{\mathrm{A_0}}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \times \frac{1}{K_b[DNA]} \quad \mathbf{Eq.\,1}$$

Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em um espectropolarímetro JASCO (J-815), na região entre 235 a 320 nm, com acúmulo de 5 scans, no modo de varredura contínua (100 nm/min) à 25 ºC. A concentração da solução de DNA em solução tampão Tris HCl (5 mM Tris HCl e 50 mM de NaCl, pH 7,4) foi fixada em 50 µM. A solução do composto foi recém preparada em DMSO (1 mM) e as adições da

solução de DNA foram realizadas de modo a se obter uma razão composto/DNA de 0,05 a 0,4; mantendo uma porcentagem de DMSO menor do que 2%. As amostras de DNA puro e DNA-composto foram incubadas em 37 ºC por 24h.

Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A ação antiproliferativa dos compostos frente às células foi determinada em parceria com o professor Fillipe Vieira Rocha da UFScar (Universidade Federal de São Carlos) utilizando o ensaio colorimétrico de viabilidae celular MTT (sal de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difenil tetrazol]. A2780cis foi cultivada em meio RPMI-1640 e as demais linhagem em meio DMEM (vitrocell®), ambos meios de cultura foram suplementados com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino). O cultivo foi realizado dentro de garrafas de plástico armazenadas em estufa a 37ºC com atmosfera de 5% de CO2.

A contagem das células foi realizada utilizando o contador automático TC20 (Bio Rad) com auxílio do corante Azul de Tripano. Após a contagem da suspenção, foram adicionadas às placas de 96 poços alíquotas com 150 µL contendo $1,5x10^4$ células mL^{-1}. As placas foram mantidas por 24h na estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 µL de uma solução de DMSO contendo os compostos de interesse.

. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos, dissolvidos em 2% DMSO por 48h. Após a incubação foi adicionado a cada poço 50 µL de uma solução de MTT (1 $mg \cdot mL^{-1}$) e incubada novamente por 4h. Os cristais de Formazan foram dissolvidos em 100 µL de isopropanol com 10% de DMSO. A densidade ópitica foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas Bio Tek modelo Epoch. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 360 e GraphPadPrism 8.0.2.

Difração de raios X de monocristal

As medidas de difração de raios X de monocristal foram realizadas pelo prof. Javier Ellena no Instituto de Física de São Carlos – USP. Os dados foram coletados a temperatura ambiente (293 K) em um difratômetro Rigaku XtaLAB mini, utilizando a radiação Mo Kα (λ = 0,710 Å), monocromatizada por cristal de grafite. As estruturas foram resolvidas por método direto usando o software SHELXT. As

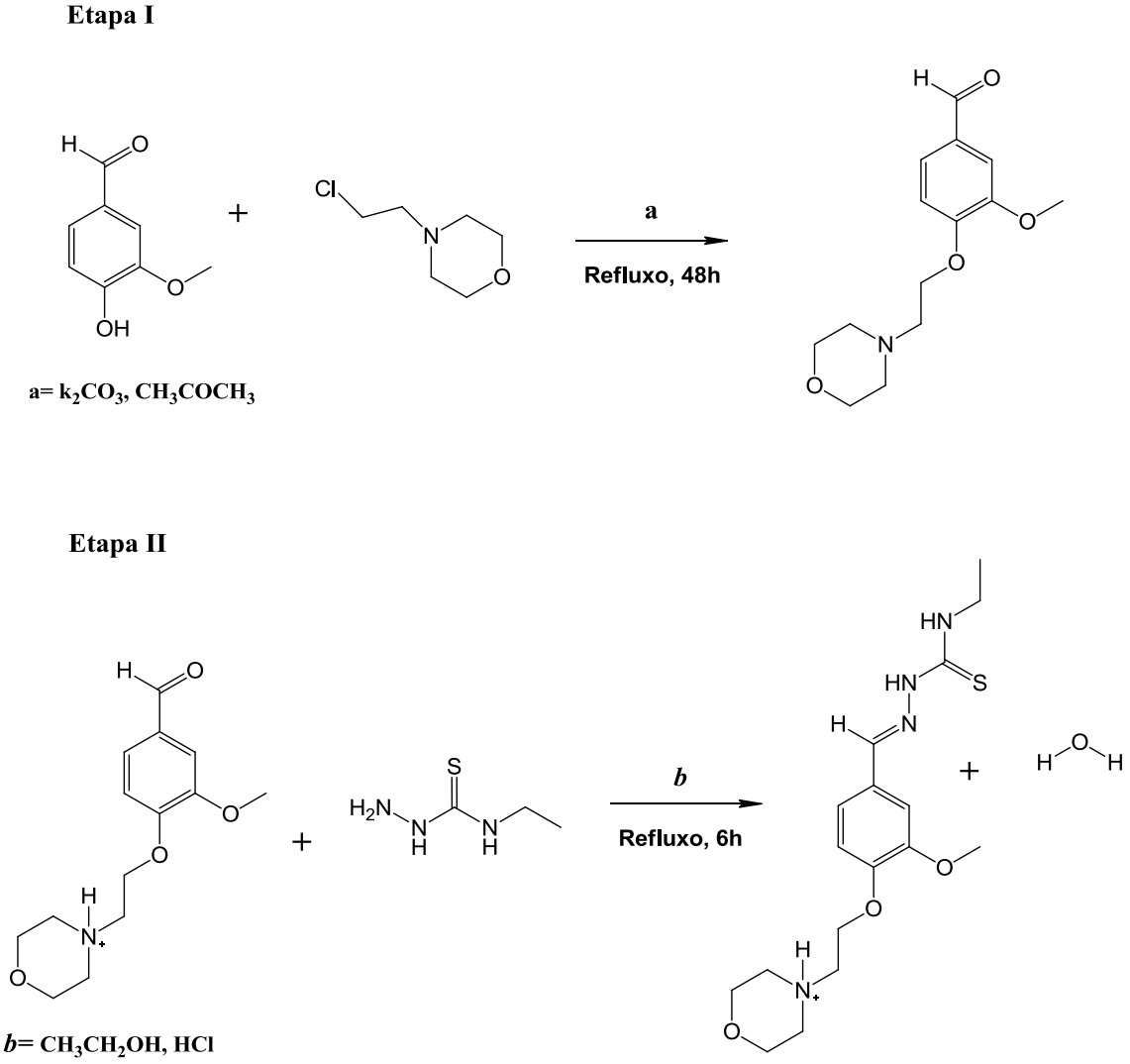
correções de redução, dimensionamento e absorção de dados foram realizadas usando CrysAlisPro. As representações gráficas das estruturas foram elaboradas com o software Mercury 4.1.

3.3 Síntese dos compostos

3.3.1 Síntese do ligante (VMTSC)

O ligante Cloreto de (E)-4-(2-(4-((2-(etilcarbamotioil)hidrazono)metil)-2-metoxifenoxi) etil)morfolina-4-ium, (VMTSC), foi sintetizado conforme procedimento já descrito na literatura com pequenas modificações [56]. No **Esquema 2** é possível observar as duas etapas de reações para obtenção do ligante: i) funcionalização do grupo fenol da vanilina e ii) condensação da vanilina funcionalizada com a etil-tiossemicarbazida.

Esquema 2: Reações para síntese do ligante VMTSC. **Fonte:** Autor.



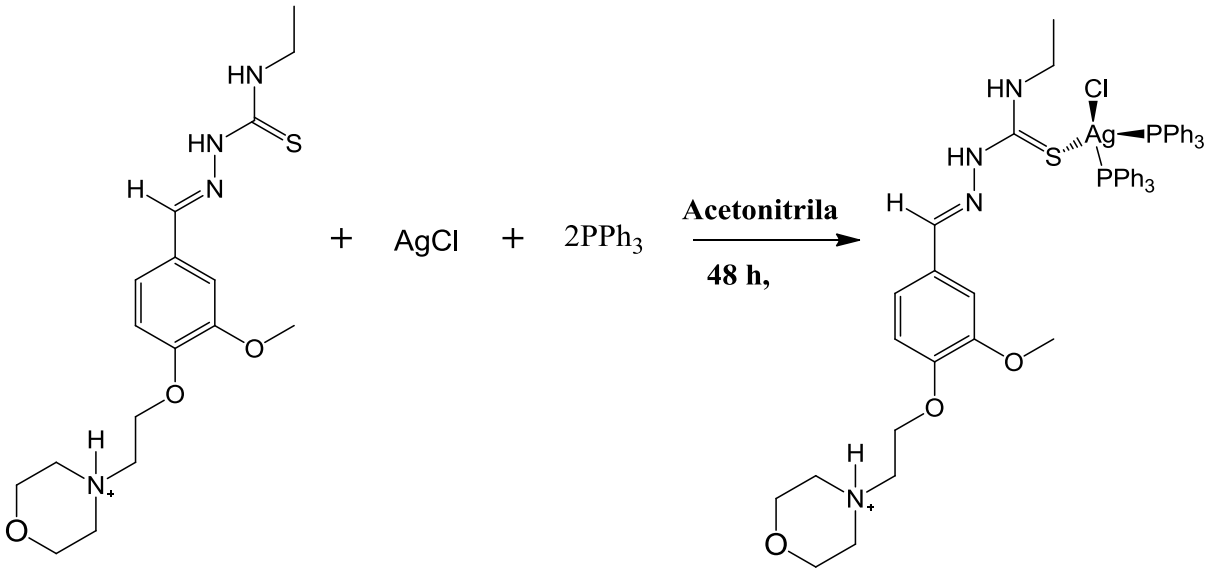
Etapa I) A vanilina (4,0 mmol) foi adicionada a um balão de fundo redondo de 100 mL de capacidade, ao qual adicionou 1,0000 g de K_2CO_3 (base desprotonante do sistema) e 30 mL de acetona. Em seguida, foi adicionado cloridrato de 1-(2-cloroetil)morfolina (3,5 mmol) e a mistura reacional foi mantida sob-refluxo e agitação por 48 h. Decorrido o tempo, a suspensão foi filtrada por filtração simples para retirada do carbonato de potássio e a solução resultante coletada, em seguida, a solução foi submetida a evaporação por rotaevaporador até a obtenção do produto concentrado. O produto foi solubilizado em diclorometano (20 mL) e a solução foi submetida a sucessivas lavagens com solução 10% NaOH (20 mL) e água destilada (20 mL) até a constatação da pureza do produto. O solvente foi removido e o produto de aspecto oleoso obtido seco à vácuo.

Etapa II) A vanilina funcionalizada obtida na etapa I, (3-metoxi-4-[2-(morfolinil)etóxi) benzaldeído), (1,9 mmol) foi solubilizada em etanol e o meio reacional acidificado. Em seguida, foi adicionado a etiltiossemicarbazida (1,9 mmol) à mistura reacional e esta foi mantida sob refluxo e agitação durante 6h. Decorrido o tempo, a mistura reacional foi armazenada até a precipitação do produto, um sólido amarelo que foi coletado e analisado por RMN e IV.

3.3.2 Síntese do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]

Para a síntese do complexo, **Esquema 3**, foi utilizado como reagentes precursores o ligante VMTSC (0,3 mmol), obtido na etapa II, e o cloreto de prata em razão equimolares. Os precursores foram solubilizados em 20 mL de acetonitrila e a reação foi promovida sob agitação durante 24 h, em ausência de luz e à temperatura constante de 55º C. Decorrido o tempo, observou-se a formação de um precipitado branco, que foi filtrado por filtração simples e seco à vácuo. Em seguida, o composto isolado reagiu com trifenilfosfina em 20 mL de acetonitrila numa proporção molar de 1:2. A reação ocorreu na ausência de luz, em agitação e aquecimento constante de 55º C durante 24 h. Decorrido o tempo, a solução reacional foi mantida a temperatura ambiente e um precipitado cristalino foi formado, o qual foi seco à vácuo e reservado para posteriores análise.

Esquema 3: Reação para síntese do complexo de fórmula [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]. **Fonte:** Autor



4. RESULTADOS E DISCUSSÂO

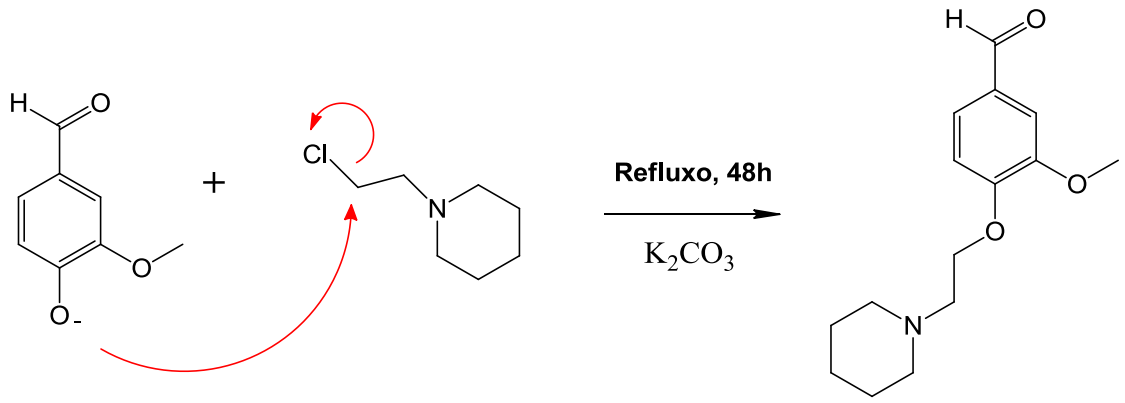
4.1 Ligante Tiossemicarbazona (VMTSC)

As reações de tiossemicarbazonas são conhecidas como reações de condensação, para a síntese dessa classe de composto é necessário um derivado carbonilado, cetona ou aldeído, para reagir com uma tiossemicarbazida em meio ácido sob refluxo.

Primeiramente, para a síntese do ligante houve a funcionalização do composto vanilina com o grupo etilmorfolina, esquema 2 (etapa 1). A busca da funcionalização foi motivada objetivando tornar o complexo mais bioativo para o meio biológico. Dessa forma, analisando a estrutura da vanilina optou-se por utilizar um meio básico razoavelmente fraco para que o único grupo atacado seja o grupo fenol da vanilina e a reação ocorra como esperado. Na **figura 17** é demonstrado o mecanismo da funcionalização.

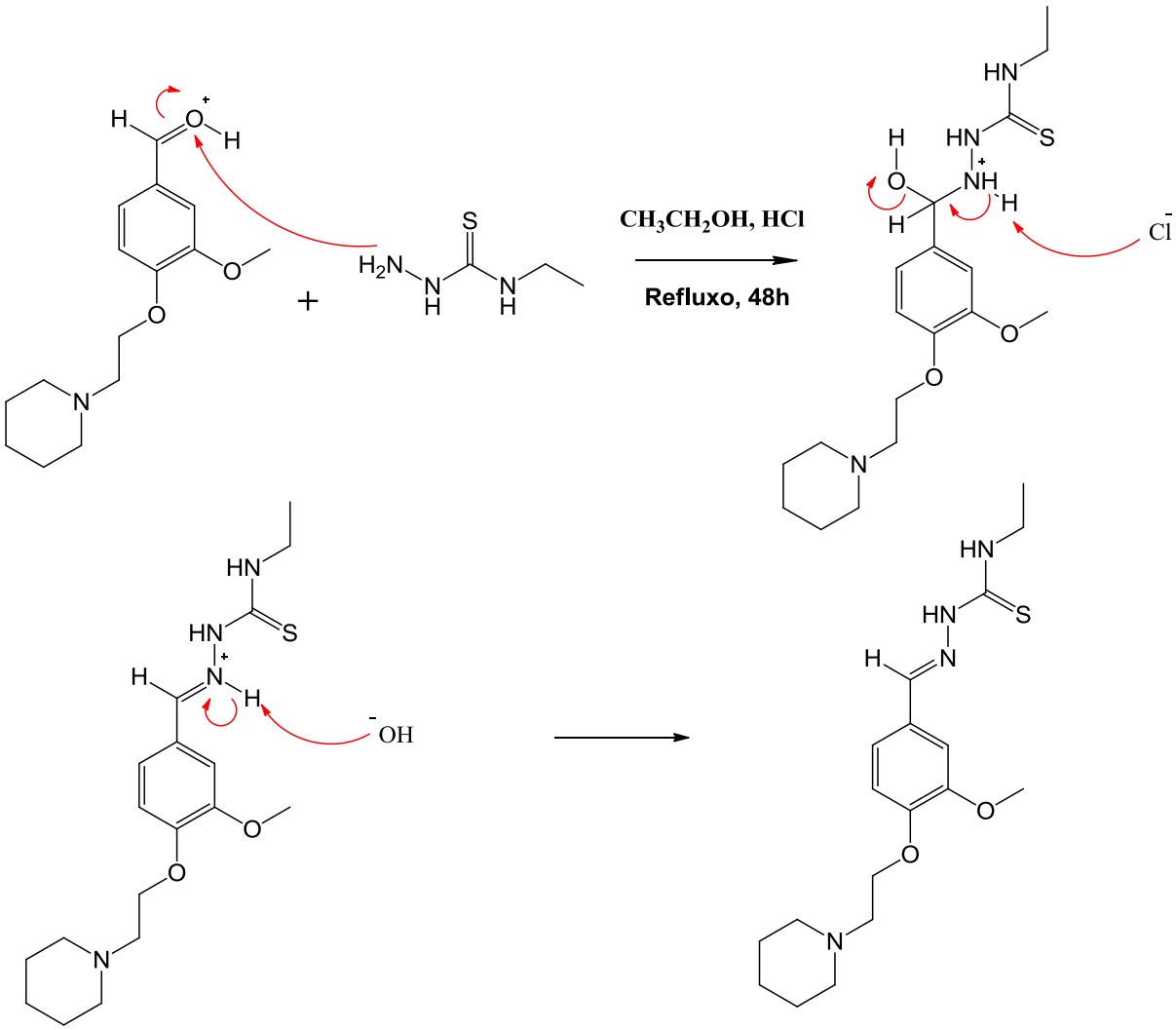
Após a funcionalização da vanilina o produto passou por sucessivas lavagens objetivando a retirada do reagente utilizado em excesso, e assim purificar o produto. Como a vanilina trata-se do reagente em excesso, as lavagens foram feitas utilizando solução básica de NaOH, pois, este atacaria o grupo fenólico tornando a vanilina mais solúvel no meio aquoso, facilitando sua remoção.

Figura 17: Mecanismo de formação da vanilina funcionalizada. **Fonte:** Autor.



Após obter a vanilina funcionalizada e purificada, aldeído necessário para obtenção do ligante, pode-se passar para a próxima etapa, esquema 2(etapa 2), síntese da tiossemicarbazona. Para isso, houve inicialmente a protonação da carbonila pertencente à vanilina, para assim, facilitar o ataque nucleofílico do nitrogênio da tiossemicarbazida. Após o ataque é formado um grupo imina, grupo este que caracteriza as tiossemicarbazonas como base de Schiff. Na **figura 18**, é demonstrado o mecanismo de formação da tiossemicarbazona.

Figura 18: Mecanismo de formação da tiossemicarbazona VMTSC. **Fonte:** Autor.



4.2 Complexo [AgCl(VMTSC)(PPh$_3$)$_2$]Cl

Para a síntese do complexo houve uma adaptação da metodologia realizada por nosso grupo de pesquisa. Dessa forma, as melhores condições foram obtidas variando parâmetros como temperatura e tempo, entre outros fatores. No **Esquema 4** são mostradas as tentativas na determinação da melhor rota de síntese do complexo. Logo, a formação do complexo de prata(I) acontece em duas etapas reacionais, a primeira pela reação entre o cloreto de prata e o ligante tiossemicarbazona, o qual deu origem a formação de um intermediário reativo, sendo essa a principal etapa da reação, a que determina o curso reacional. Essa reação ocorre pelo ataque do átomo de enxofre da tiossemicarbazona ao cátion Ag^+.

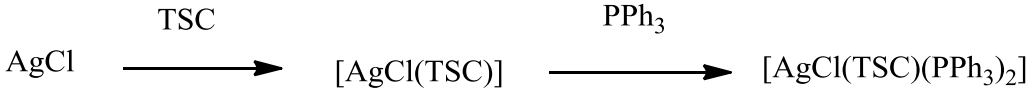
Na segunda etapa temos a reação entre o produto intermediário e o ligante trifenilfosfina formando o produto almejado.

Esquema 4: Rota de síntese do complexo $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]Cl$. **Fonte**: Autor.

Tentativa 1



Tentativa 2



4.3 Análise Elementar

Tanto o ligante quanto seu complexo foram obtidos no estado sólido e, após seco a vácuo, foram devidamente caracterizados. Na **Tabela 2** são apresentadas as características físicas dos compostos bem como seus respectivos rendimentos. Na **Tabela 3** são apresentados os dados de análise elementar.

Tabela 2: Dados físicos e rendimentos dos compostos sintetizados. **Fonte:** Autor.

Composto	Coloração	Rendimento % (Mg)
Ligante (VMTSC)	Amarelo	60 (415 mg)
$[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]Cl$	Branco	55,15 (64,2 mg)

Tabela 3: Dados de análise elementar (CHN) para os compostos sintetizados. **Fonte:** Autor.

Composto	Fórmula	% C exp (calc)	% N exp (calc)	% H exp (calc)
Ligante	$C_{17}H_{27}ClN_4O_3S.H_2O$	48,54 (48,50)	12,49 (13,31)	6,94 (6,94)
Complexo	$C_{53}H_{56}AgCl_2N_4O_3P_2S.$	58,48 (59,45)	5,47(5,37)	5,32(5,23)

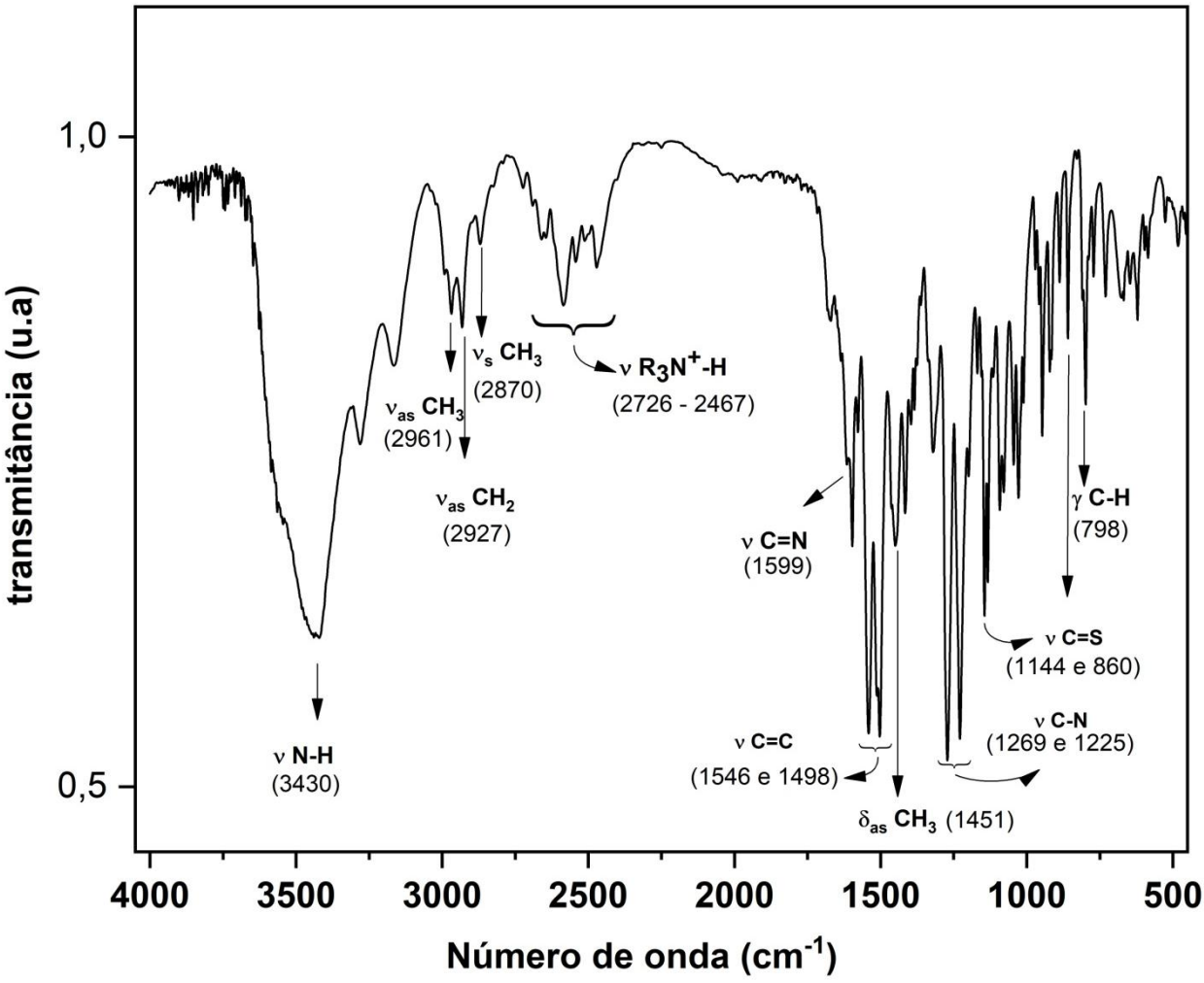
Como está descrito na tabela 1 os compostos foram obtidos com rendimentos satisfatórios (> 50%). Conforme os dados de análise elementar apresentados na tabela 2, o teor de carbono, nitrogênio e hidrogênio obtidos para as amostras se aproximam dos valores calculados a partir da fórmula mínima proposta, demonstrando a pureza dos compostos. O ligante encontra-se na forma hidratada e o complexo na forma cloridrato.

4.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

4.4.1 Ligante (VMTSC)

Na **Figura 19** é apresentado o espectro de infravermelho obtido para o ligante Cloreto de (*E*)-4-(2-(4-((2-(etilcarbamotioil)hidrazono)metil)-2-metoxifenoxi)etil) morfolin-4-ium **(VMTSC).**

Figura 19: Espectro de infravermelho obtido para o ligante VMTSC. **Fonte:** Autor.



Em busca de informações estruturais do ligante VMTSC fez-se uso da técnica espectroscópica no infravermelho. Conforme a reação proposta no **Esquema 2** (parte *2*), temos uma conversão do grupo funcional carbonila C=O, do grupo aldeído da vanilina funcionalizada em um grupo imina, C=N. Comparando o espectro do composto precursor (vanilina funcionalizada) com o espectro obtido para o ligante pode-se constatar que houve a formação do grupo C=N devido ao desaparecimento da banda na região de 1675 cm^{-1} (νC=O) e o surgimento de uma nova banda em 1599 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo νC=N.

O fragmento tiossemicarbazida do ligante possui estrutura básica C=N-NH-CS- NH_2 contendo dois grupos NH distintos (uma amina secundária, e uma amina primária terminal). Dessa maneira, espera-se o aparecimento de bandas referentes a estiramentos na região que correspondam a esses tipos de aminas. Bandas de estiramento νN-H em tiossemicarbazonas são divididas em duas regiões, uma em 3450-3210 cm^{-1} característico do grupo N-H hidrazínico e 3180-3150 cm^{-1} devido ao grupo N-H terminal.

Dessa forma, a identificação da banda alargada na região de 3430 cm^{-1} no espectro é atribuida ao estiramento da ligação νN-H hidrazínico e a presença de um ombro nesta mesma banda em 3175 cm^{-1} é atribuida ao νN-H terminal, **Figura 19**. O alargamento da banda referente ao estiramento da ligação νN-H pode estar relacionada à presença de grupo OH devido à hidratação do ligante. Ainda há duas bandas de alta intensidade nas regiões de 1269 e 1225 cm^{-1}referentes ao estiramento da ligação νC-N.

De acordo com a estrutura do ligante, tem-se uma amina terciária presente no anel do grupo morfilina que, em meio ácido, torna-se protonado dando origem a um sistema amônio, R_3N^+-H. Dessa forma, observa-se um conjunto de bandas de baixa intensidade na região 2726-2467 cm^{-1} referente a esse sistema, indicando a protonação do anel etilmorfolina no ligante livre.

As bandas referentes aos grupos alifáticos no ligante livre mantiveram-se inalterada quando comparado com o espectro do reagente precursor (vanilina funcionalizada). As bandas que se referem aos estiramentos assimétrico νCH_3 e νCH_2 são observadas em 2961 e 2927cm^{-1}, respectivamente, e a banda de estiramento simétrico CH_3 em 2870 cm^{-1}. Ainda são observadas bandas de forte intensidade em 1546 e1498 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação νC=C presente no sistema aromático da vanilina. Além dessas, são observadas bandas

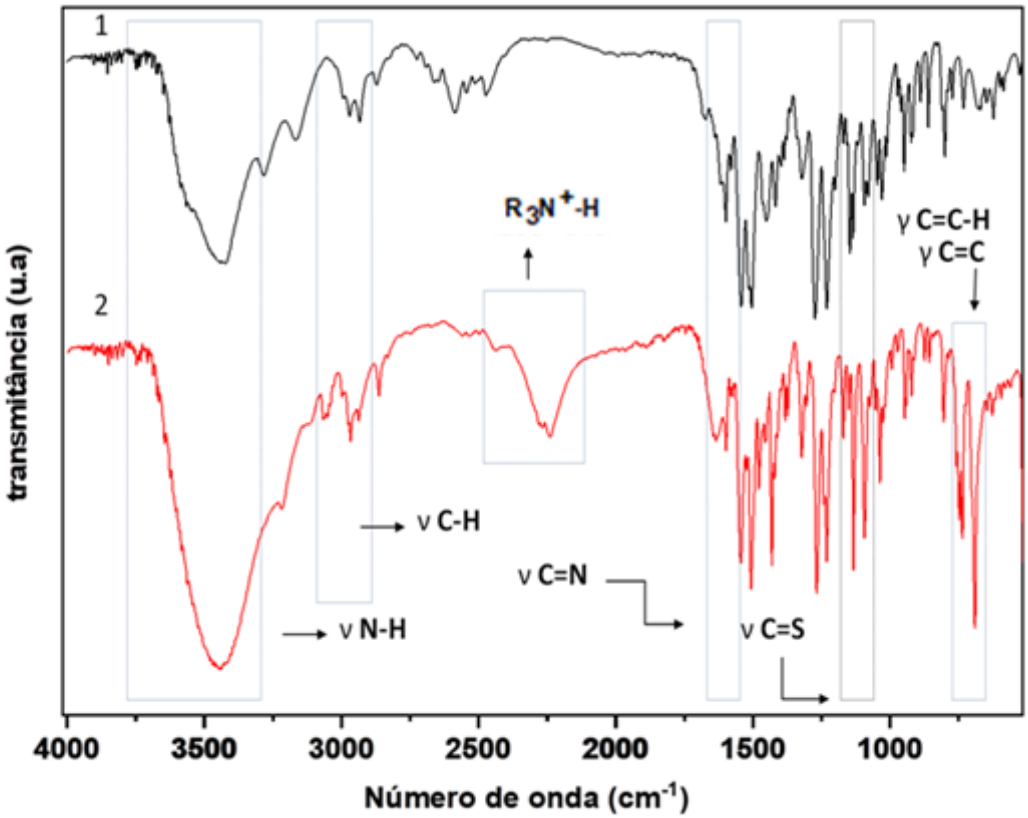
que se referem a deformações angulares fora do plano para as ligações C=C e C=C-H.

A caracterização das bandas referentes ao estiramento da ligação C=N, grupo imina, e do estiramento C=S, grupo tiocarbonil, são de fundamental importância, pois, são grupos específicos presentes na estrutura do ligante que posteriormente podem estar envolvidos na coordenação ao centro metálico. O grupo tiocarbonil, destaca-se neste contexto, pois, é através do átomo de enxofre deste grupo que se propõem a coordenação do ligante ao centro metálico. Desta forma, espera-se alteração do momento de dipolo da ligação C=S, modificando o estiramento desta ligação e consequentemente deslocando a respectiva banda. A absorção no infravermelho de tiossemicarbazonas, resultante da vibração de alongamento da ligação C=S, foi atribuída por vários autores a frequências que variam próximo a 800 cm^{-l} e próximo a 1500 cm^{-1}. No espectro do ligante a contribuição dessas vibrações é observada em 860 e 1144 cm^{-1}.

4.4.2 Complexo de fórmula [AgCl(VMTSC)PPh_3]

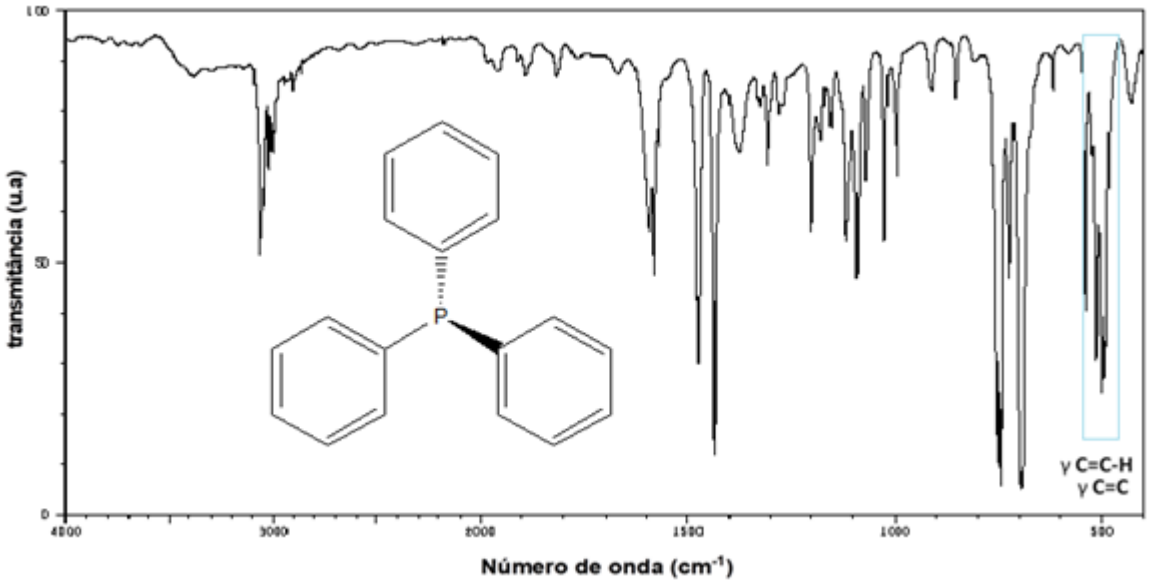
Na **Figura 20** são apresentados os espectros no infravermelho referente ao ligante livre (em preta) e do complexo obtido [AgCl(VMTSC)$(PPH_3)_2$] (em vermelho). De início podemos perceber que as bandas observadas na região de 2726 - 2467 cm^{-1} no espectro do ligante livre, características do grupo R_3N^+-H, sofre um deslocamento quando comparado com o espectro do complexo, sendo observado em torno de 2250 cm^{-1}.

Figura 20: Espectro do ligante VMTSC livre em preto (1) e do complexo com fórmula [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] (2). **Fonte:** Autor.



O espectro no infravermelho do complexo quando comparado com o espectro do ligante trifenilfosfina (PPh_3), **Figura 21**, apresenta bandas em 692 e 748 cm^{-1} de grande intensidade em comum. Estas bandas referem-se às vibrações das ligações da trifenilfosfina, evidenciando a presença deste ligante na estrutura do complexo formado. Especificadamente, a banda em 692 cm^{-1} é característica de benzeno monosubstituído, atribuída a deformação angular fora do plano da ligação C=C, e a banda em 748 cm^{-1} refere-se a benzeno monosubstituido, característica do estiramento νC-H da ligação C=C-H dos 5 hidrogênios adjacentes.

Figura 21: Espectro do ligante trifenilfosfina PPh_3. **Fonte:** Autor.



As bandas referentes à trifenilfosfina e o deslocamento da banda referente ao grupo R_3N^+-H do ligante VMTSC são as duas grandes mudanças que se pode observar no espectro do complexo de imediato. Contudo, conforme os dados da **Tabela 4**, constata-se a ocorrência de deslocamentos nas posições das bandas do ligante livre em comparação ao ligante complexado, principalmente nas bandas que se referem aos grupos N-H, C=N e C=S, que são os núcleos coordenantes/próximos ao centro de coordenação.

A banda referente ao estiramento C=S no complexo sofreu um pequeno deslocamento para número de onda menor, com deslocamento de 9 cm^{-1}. A coordenação do átomo de enxofre ao centro metálico faz com que a densidade eletrônica da ligação C=S seja direcionada ao enxofre, causando um alongamento na ligação, e consequentemente, diminuindo a frequência do estiramento νC=S, deslocando a banda para menores números de onda. Está condição pode indicar a coordenação do átomo de enxofre ao centro metálico conforme proposto.

Tabela 4: Dados de infravermelho obtido para o ligante VMTSC livre e para o complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]. **Fonte:** Autor.

Atribuições	**cm^{-1}**	
	(VMTSC)	**Complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]**
ν N-H $_{sec}$	3430 F	3446 F
ν_{as} CH_3	2961f	2995 f
ν_{as} CH_2	2927 f	2971f
ν_s CH_3	2870 f	2946 f
ν R_3N^+-H	2726-2467 f	2500 f
ν C=N	1599 m	1602 m
ν C=C	1546 e 1498 m	1543 e 1509 m
ν C=S	1144 m	1119 m
	862 f	853 f
δ_{as} CH_3	1451f	1480 f
ν C-N	1269 e 1225 f	1268-1234 f
γ C-H $_{(2H\ adj)}$	798 f	801 f
γ C-H	*	737 m
γ C-H $_{(5H\ adj)}$	*	691m

Intensidade relativa da banda: forte (F); fraca (f); média (m).
* = bandas não observadas.

As demais bandas de fraca intensidade presentes em ambos os espectros, localizadas na região de impressão digital da molécula (região complexa do espectro) são bandas de difícil atribuição devido à sobreposição de bandas, por exemplo. Estas bandas, por não se referirem a grupos funcionais diretamente envolvidos na formação do complexo, não foram destacadas.

4.5 Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear

4.5.1 Ligante (VMTSC)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é sem dúvida uma das técnicas instrumentais mais poderosas para a análise da configuração relativa de compostos orgânicos em solução. Desta forma, para comprovação da obtenção do ligante VMTSC foram obtidos espectros de RMN unidimensionais de **^{1}H, ^{13}C**. Quanto aos experimentos bidimensionais foram obtidos espectros de **COSY** (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*), **HSQC** (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e **HMBC** (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*). Todos os espectros foram obtidos em DMSO-d_6, onde a integração dos picos e a presença de um único conjunto de sinais demonstrou a existência de apenas uma espécie em solução. A caracterização dos sinais nos espectros seguirá a numeração apresentada na **Figura 22** e na **Figura 23** é apresentado o espectro de RMN ^{1}H obtido para o ligante.

Figura 22: Numeração adotada para a estrutura do ligante VMTSC. **Fonte:** Autor.

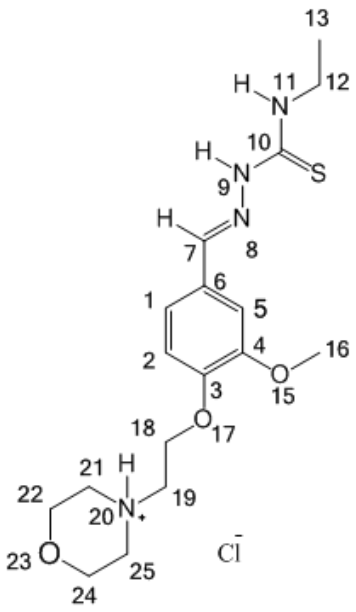
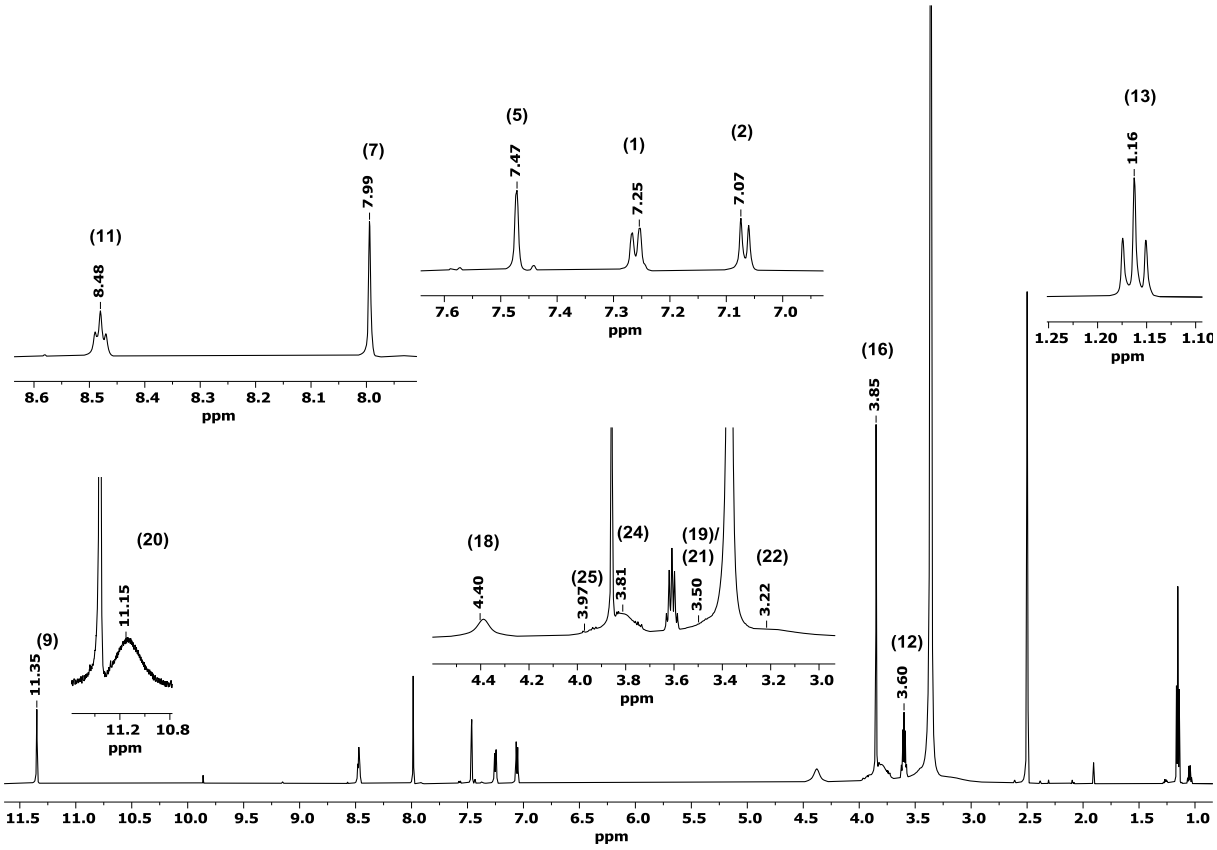


Figura 23: Espectro de RMN de ^{1}H (14,1 T) do ligante VMTSC em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.



Na **Figura 23** é apresentado o espectro de RMN ^{1}H para o ligante. Os sinais mais desblindados, na região de 11,35 e 11,15 ppm que aparecem na forma de singletos correspondem aos hidrogênios dos grupos NH da molécula. O sinal em 11,35 ppm corresponde ao hidrogênio H9, que encontra-se ligado ao grupo tiocarbonil, sofrendo, desta forma, efeito retirador de elétrons pelo deslocamento da densidade eletrônica para o átomo de enxofre. O segundo sinal em 11,15 ppm é atribuído ao hidrogênio H20 que, por se tratar de um sistema amônio onde o nitrogênio encontrasse carregado positivamente, é induzido um ambiente de menor densidade eletrônica e, consequentemente, um maior deslocamento químico para esta próton.

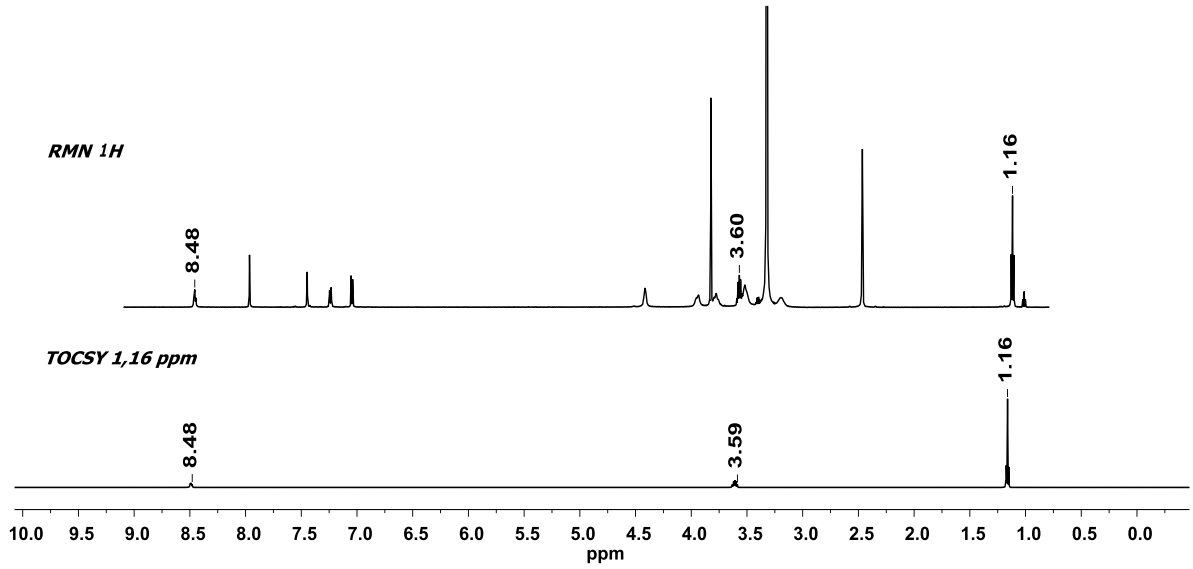
Na região dos hidrogênios aromáticos, podemos observar um conjunto de três sinais em 7,47; 7,25 e 7,07 ppm que são atribuídos aos hidrogênios do anel aromático da vanilina e correspondem, respectivamente, aos hidrogênios H5, H1 e H2. Os sinais em 7,47 ppm (J_{51} = 2 Hz) e 7,07 ppm (J_{21} = 8,3 Hz) aparecem na forma de dubletos, enquanto que o sinal em 7,25 ppm aparece na forma de duplo dubleto (J_{125}= 8,3; 2 Hz). O singleto em 7,99 ppm corresponde ao hidrogênio H7

pertencente ao grupo imina C=N, enquanto o tripleto em 8,48 ppm (J_{1112}= 6,0Hz) corresponde ao hidrogênio H11 do grupo NH ligado ao grupo etil da porção tiossemicarbazona.

Os sinais na região dos hidrogênios alifáticos aparecem alargados pela influência que os átomos de nitrogênio e oxigênio exercem sobre o tempo de relação desses prótons. Dentre esses sinais, há um singleto em 3,85 ppm correspondente ao hidrogênio H16 do substituinte metoxila da vanilina, um tripleto em 1,16 ppm (J_{1312} = 7,1 Hz) referente aos hidrogênios H13 da metila do substituinte etil da tiossemicarbazona. Os demais sinais na região de hidrogênios alifáticos não puderam ser atribuídos pelo experimento de RMN ^{1}H, sendo necessários outros tipos de experimentos unidimensionais e bidimensionais para completar a caracterização.

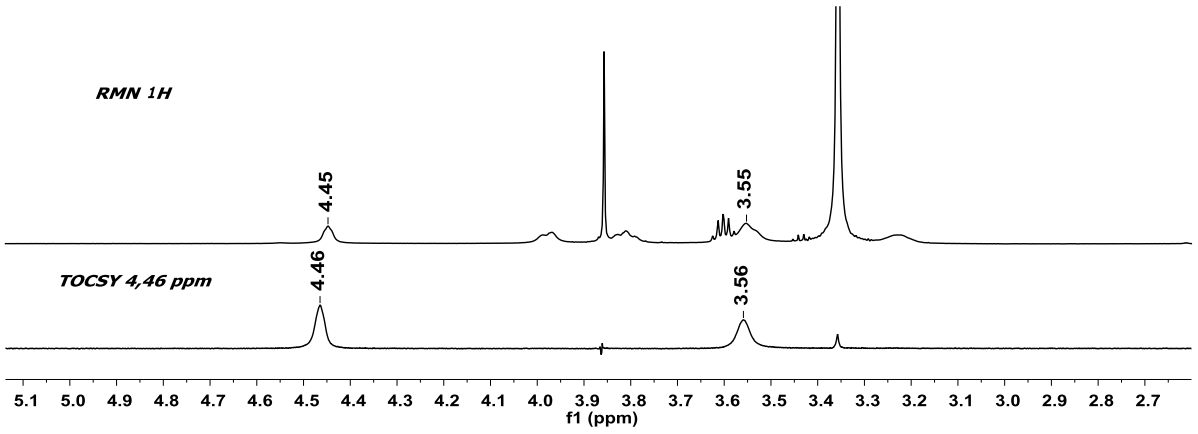
O experimento de TOCSY é uma técnica mais sensível em detectar o acoplamento de hidrogênios. Dessa forma, o espectro TOCSY é uma ferramenta útil na identificação de prótons forte e fracamente acoplados, incluindo acoplamentos a longa distância (J^3 e J^4), que pertencem a um sistema de spin isolado. A transferência de magnetização entre os prótons dentro da mesma rede de acoplamento fornece subespectros 1D de prótons dos sistemas de spin. Dessa forma, fazendo uso desta técnica, houve a irradiação no tripleto em 1,16 ppm que resultou no aparecimento de dois sinais, um em 8,48 ppm e outro em 3,60 ppm que se referem, respectivamente, aos hidrogênios H11 do grupo NH e ao hidrogênio H12 do grupo metileno pertencente ao substituinte etil da tiossemicarbazona, demonstrando que estes 3 hidrogênios compõem um mesmo sistema de spin. O espectro TOCSY obtido é apresentado na **Figura 24.**

Figura 24: Espectro de RMN do experimento TOCSY 1D (14,1 T) com irradiação do sinal em 1,16 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.



Ainda utilizando a técnica TOCSY, a irradiação do sinal em 4,46 ppm indicou um conjunto de spin constituído por dois sinais, em 4,46 ppm e outro em 3,56 ppm. A partir disso, atribuiu-se os sinais em 4,46 ppm e 3,56 ppm aos hidrogênios H18 e H19 que constituem o substituinte etil do anel morfolina que representa o único sistema de spin com dois hidrogênios da molécula. O espectro obtido para este experimento é apresentado na **Figura 25**.

Figura 25: Espectro de RMN do experimento TOCSY 1D (14,1 T) com irradiação no sinal 4,46 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.

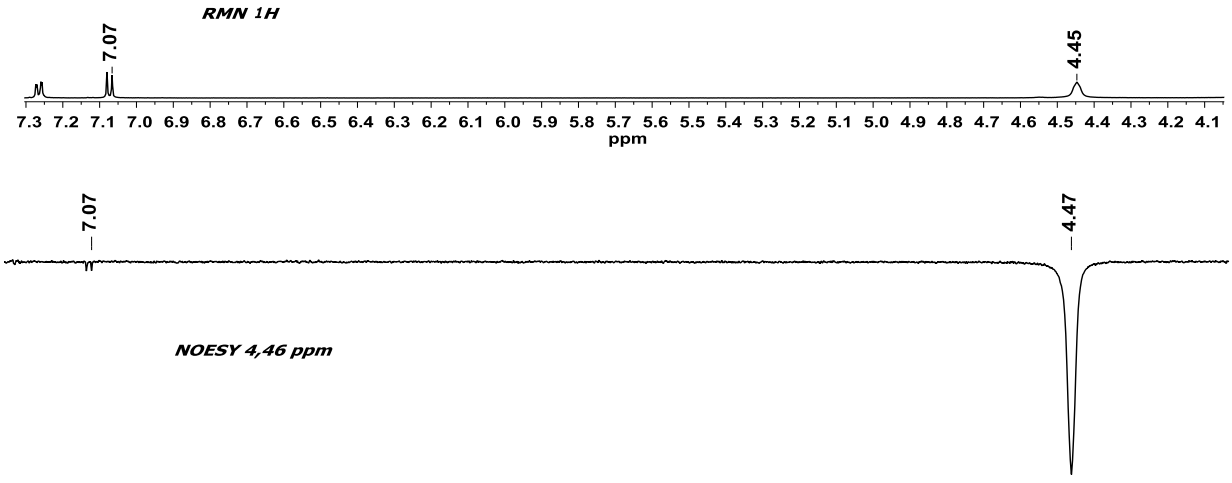


Tendo em vista a estrutura proposta para o ligante, no intuito de distinguir prótons por suas disposições espaciais, pode-se utilizar o experimento NOESY, *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*. Esta técnica estabelece

correlações entre Hidrogênios próximos espacialmente que interagem devido ao NOE, desta maneira, os dois núcleos não precisam estar diretamente ligados, mas apenas próximos um do outro, em geral por volta de uma distância de até 4Å. Através desta técnica é possível estabelecer a configuração relativa de cada hidrogênio na molécula. Dessa forma, o experimento de NOESY 1D realizado, cujo espectro é apresentado na **Figura 26**, pôde elucidar o posicionamento do grupo etil morfolina presente no ligante, além de, confirmar as atribuições já feitas através do RMN ^{1}H dos hidrogênios aromáticos da vanilina.

Primeiramente avaliou-se o efeito NOE sobre o hidrogênio H18 com o experimento NOESY irradiando o sinal 4,46 ppm. Podemos perceber que este hidrogênio encontra-se espacialmente próximo ao hidrogênio aromático H2 da porção vanilina cujo sinal aparece em 7,07 ppm Desta forma, pode-se constatar que o substituinte etil da fração morfolina da molécula esta posicionado como descrito no Figura 22.

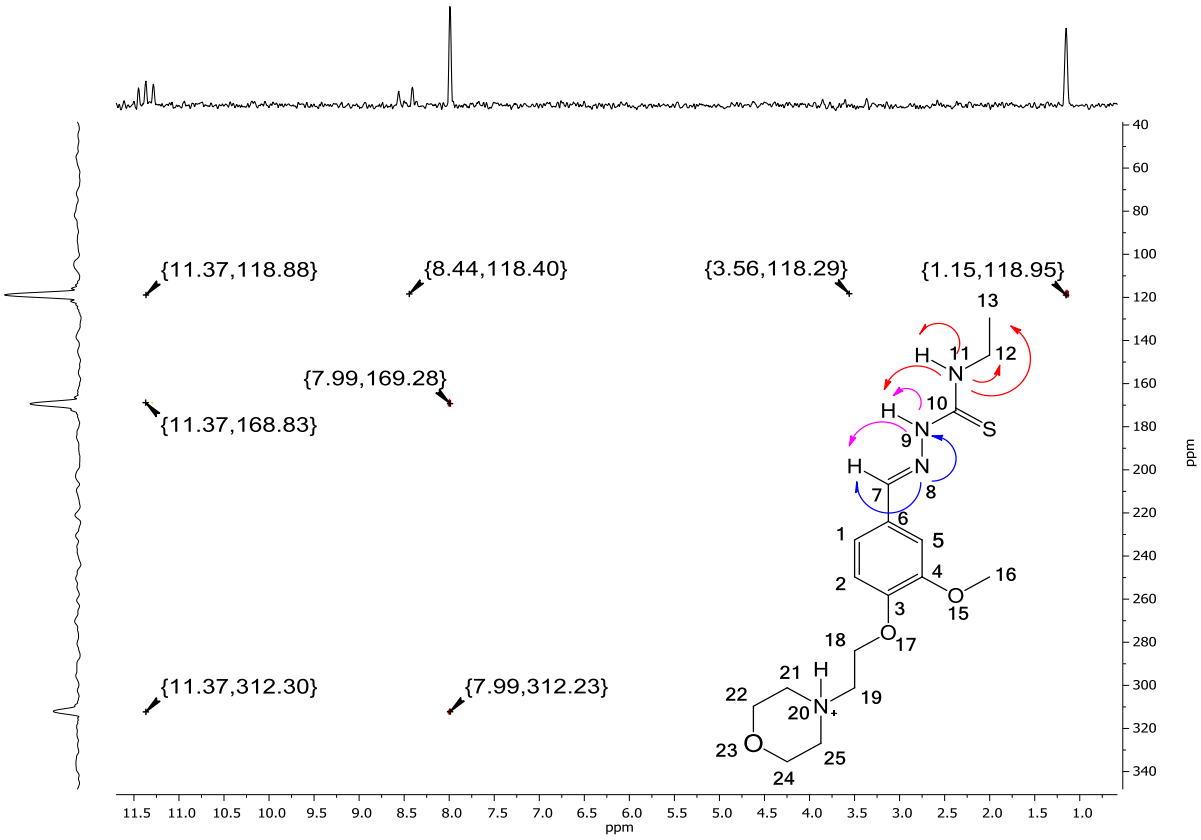
Figura 26: Espectro de RMN do experimento NOESY 1D (14,1 T) para o sinal 4,46 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



Para atribuição dos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênios na molécula realizou-se o experimento bidimensional de RMN HMBC^{1}H-^{15}N, cujo mapa de contorno é apresentado na **Figura 27**. Conforme pode se observar, apenas os nitrogênios pertencentes a fração tiossemicarbazida tiveram suas correlações detectadas. No mapa de contorno apresentado é possível observar tanto correlações a longas distâncias como correlações diretas. De acordo com os

deslocamentos químicos apresentados, o sinal em 118,83 ppm se refere ao N11 que correlaciona-se com os hidrogênios H11, H12, H13 e H9. O sinal na região de 168,83 ppm é característico para grupos amida, portanto sendo atribuído ao N9, que correlaciona-se aos hidrogênios H9 e H7. O sinal em 312,12 ppm corresponde ao nitrogênio N8 do grupo imina, estando correlacionado aos hidrogênios H7 e H9. As correlações descritas podem ser visualizadas pela representação em setas curva na estrutura do ligante representada no espectro.

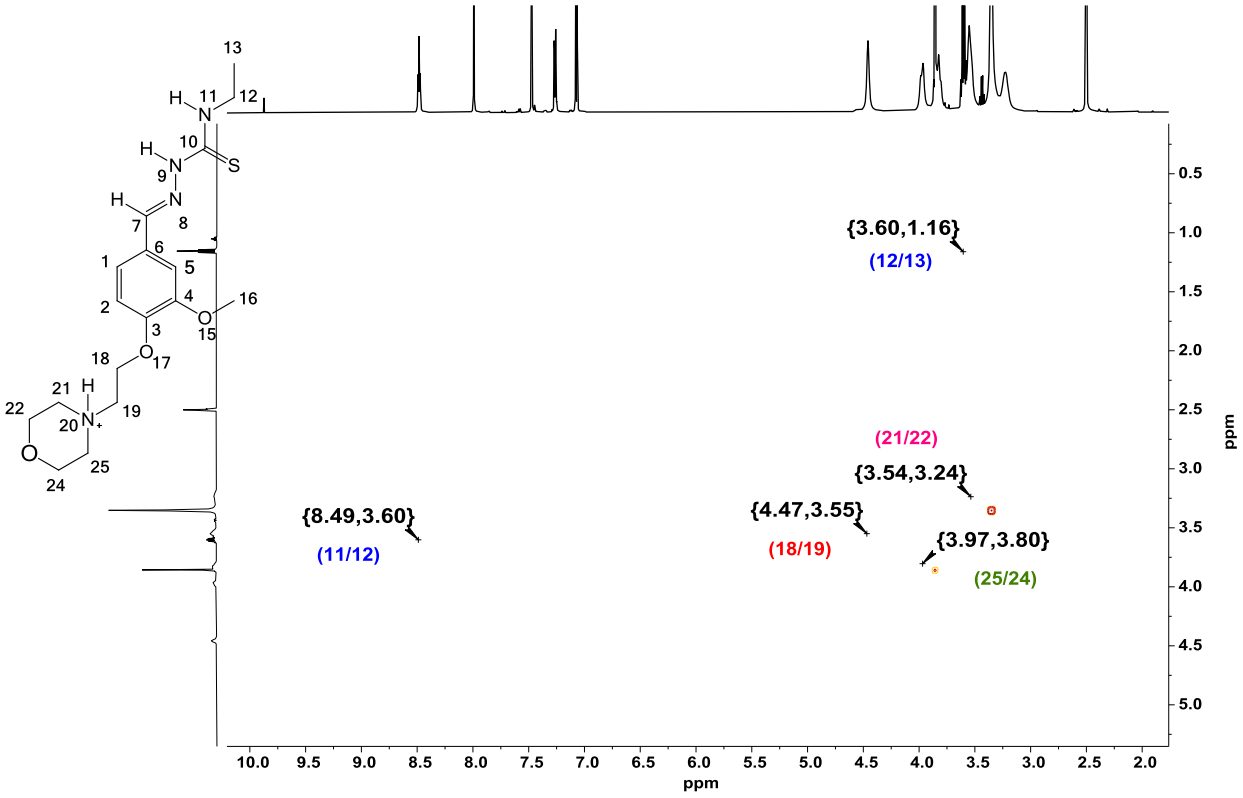
Figura 27: Mapa de contorno HMBC 1H-15N (14,1 T) obtido para o ligante VMTSC, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



Com relação aos sinais dos hidrogênios alifáticos que coincidem com os do grupo etilmorfolina, o espectro de RMN COSY, **Figura 28**, permitiu a distinção entre eles. Logo, como evidenciado pelo experimento de TOCSY 1D, o sinal em 4,45 ppm referente ao H18 correlaciona-se com um dos sinais sobrepostos na região de 3,55 ppm, sendo este sinal referente ao H19 pertencente ao substituinte etil da porção etilmorfolina. O anel morfolina, por se tratar de um derivado do ciclohexano, pode apresentar-se em diferentes conformações, sendo as mais comuns e estáveis a

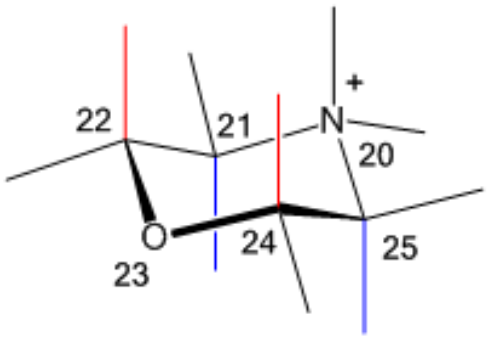
conformação “cadeira” e “barco”. Isso faz com que os hidrogênios pertencentes a este anel apresentem diferentes deslocamentos químicos.

Figura 28: Espectro de RMN COSY (14,1 T) para o ligante VMTSC, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



Como a conformação cadeira para o anel morfolina é a mais estável, considerando um sistema derivado do ciclohexano, **Figura 29**, observamos, através do espectro COSY, a correlação do sinal em 3,54 ppm com o sinal em 3,22 ppm, que foi referenciado aos hidrogênios H21 e H22, respectivamente. Estes hidrogênios correlacionam-se e, portanto, são detectáveis pela técnica.

Figura 29: Representação da conformação cadeira do anel morfolina. **Fonte:** Autor



Alem desta, podemos detectar a correlação do sinal em 3,97 ppm com o sinal em 3,81 ppm, estes sinais pode ser associados aos hidrogênios H25 e H24, respectivamente. Devido à proximidade dos hidrogênios H21 e H25 ao grupo amônio, **Figura 29**, sabe-se que estes apresentam maiores deslocamentos químicos em relação aos hidrogênios H22 e H24. Contudo, os sistemas de spins H21/H22 e H21/25 não podem ser diferenciados devido ao ambiente químico próximo aos quais se encontram. Alem disto, estes sinais apresentam-se claramente sobrepostos devido ao alargamento ocasionado pelo efeito anisotrópico dos heteroátomos presentes na estrutura do anel, impossibilitando a determinação da multiplicidade dos sinais e consequentemente inviabilizando a determinação das constantes de acoplamento. Além disso, o sinal da água do solvente deuterado se sobrepõe na região do espectro avaliado, dificultando a determinação clara dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel morfolina.

Com as correlações avaliadas pelo experimento de HSQC-^{13}C,^{1}H, **anexo 01**, observou-se os deslocamentos químicos dos átomos de carbono aromáticos não quaternários em 121,46 (C1), 113,82 (C2) e 109,79 (C5) ppm. Os átomos de carbono do substituinte etil no fragmento tiossemicarbazona apareceram em 38,27 (C12) e 14,73 ppm (C13). Quanto na porção etilmorfolina, os carbonos C18 e C19 apresentaram sinais em 63,68 e 54,93 ppm, respectivamente. Os carbonos do anel morfolínico (carbonos C22, C24, C21 e C25), em função da similaridade de ambiente químico, os carbonos C22 e C24 originam um mesmo sinal alargado em 63,23 ppm, enquanto os carbonos C21 e C25, da mesma forma, apresentam-se como um sinal alargado em 51,91 ppm.

Como esperado, houve ausência dos sinais no experimento de HSQC-^{13}C,^{1}H para os quatro carbonos quaternários (C3, C6, C4 e C10). Através das correlações do mapa de contorno HMBC-^{13}C,^{1}H, foram definidos os sinais dos carbonos do anel aromático da vanilina em δ149,45 (C3), δ128,25 (C6) e δ148,62 (C4), sendo o ultimo sinal atribuído por associação. Na **tabela 3** são apresentadas as principais atribuições do RMN ^{1}H e ^{13}C para o ligante VMTSC, obtidos a partir da análise dos experimentos unidimensionais e bidimensionais.

Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C para o ligante VMTSC (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor

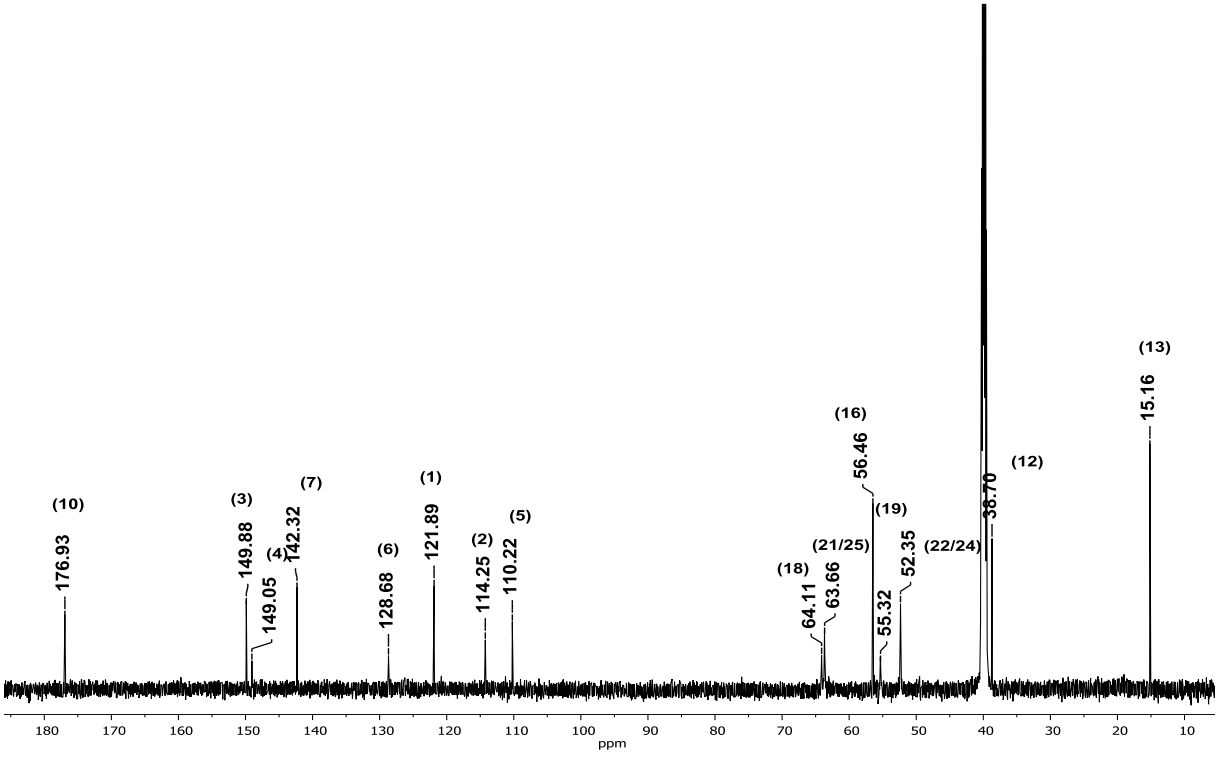


Tabela 5: Dados gerais de RMN caracterizados para o ligante VMTSC. **Fonte:** Autor

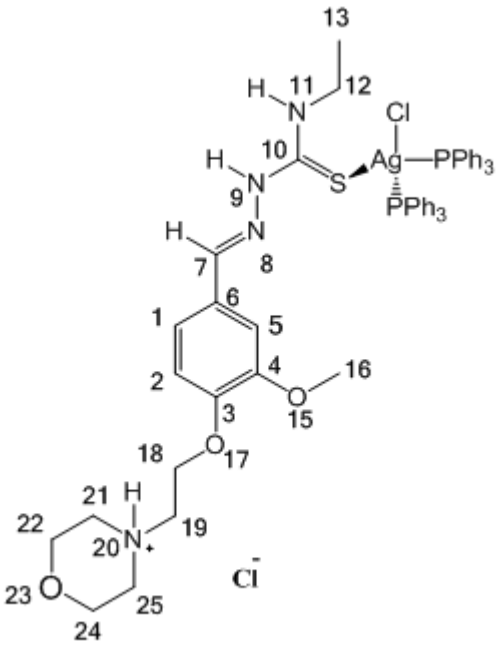
Posição	δ ppm	
	^{1}H	^{13}C
1	7,26; *dd*; [1H]; *J* = 2,0 Hz	121,54
2	7,07; *d*; [1H]; *J* = 8,3 Hz	113,96
3	*	149,45
4	*	148,62
5	7,48; *d*; [1H]; *J* = 8,3 Hz J= 2,0 Hz	110,05
6	*	128,25
7	7,99; *s*; [1H]	141,98
9	11,35; *s*; [1H]	**
10	*	176,55
11	8,48; *t*; [1H]; *J* = 6 Hz	**
12	3,60; *d+q*; [2H]; *J* = 6 Hz e *J* = 7,1 Hz	38,35
13	1,16; *t*; [3H]; *J* = 7,1 Hz	14,80
16	3,85; *s*; [3H]	56,18
18	4,40; s_{al}; [2H]	63,83
19	3,54; s_{al}; [4H]	55,42
20	11,15; s_{al}; [1H]	**
21	3,54; s_{al}; [2H]	63,48 (3,97)
22	3,24; s_{al}; [4H]	52,06 (3,52)
24	3,80; s_{al}; [2H]	51,93 (3,23)
25	3,97; d_{al}; [2H]	63,52 (3,81)

Multiplicidade: s=singleto; d=dupleto; t=tripleto; dd=duplo dubleto; s_{al}: sinal alargado.
* = Carbono quaternário. ** = Hidrogênio ligado a nitrogênio.

4.5.2 Complexo de fórmula [AgCl(VMTSC)PPh_3]

O complexo [AgCl(VMTSC)$(PPh_3)_2$], **Figura 31**, foi caracterizado pela técnica de RMN com a finalidade de se obter informações estruturais e do comportamento em solução do composto pela presença ou não de isômeros. Dessa forma, foram obtidos espectros de RMN ^{1}H, **Figura 32**, e ^{31}P, **Figura 33**, para o complexo sintetizado. O espectro de RMN ^{31}P apresenta apenas um único sinal em 4,62 ppm evidenciando a coordenação dos ligantes fosfínicos ao centro metálico. O único sinal observado é consistente com a troca intermolecular rápida dos ligantes em solução [72].

Figura 31: Representação da estrutura proposta para o complexo [AgCl(VMTSC)$(PPh_3)_2$] com a numeração adotada. **Fonte:** Autor



Em uma primeira análise do espectro de RMN ^{1}H, **Figura 32**, obtido para o complexo pode-se observar a existência de uma única espécie em solução, pela presença de um único conjunto de sinais no espectro. Em todo o espectro é possível observar os sinais dos hidrogênios pertencentes aos ligantes VMTSC e fosfínicos, corroborando com os resultados prévios de espectroscopia na região do infravermelho e fornecendo indícios da formação do complexo proposto.

Figura 32: Espectro de RMN de 1H do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor

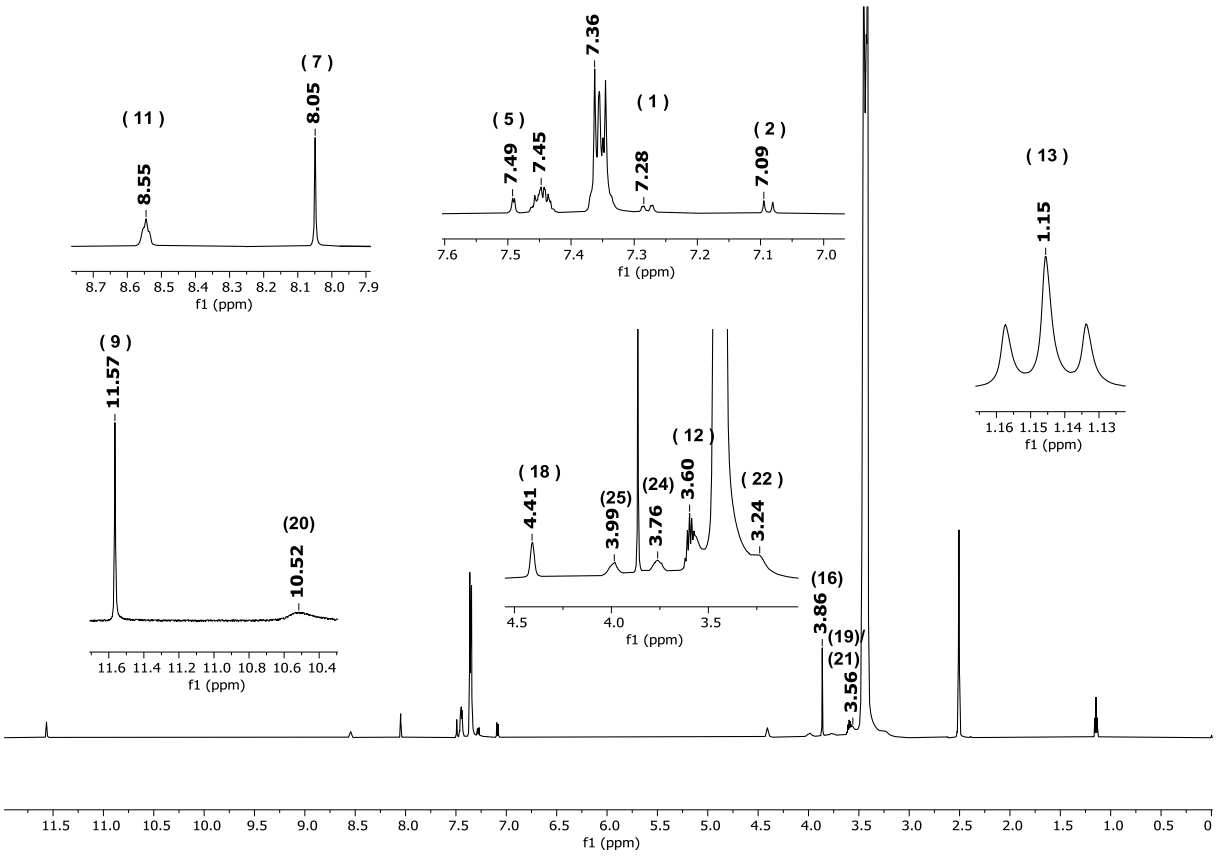
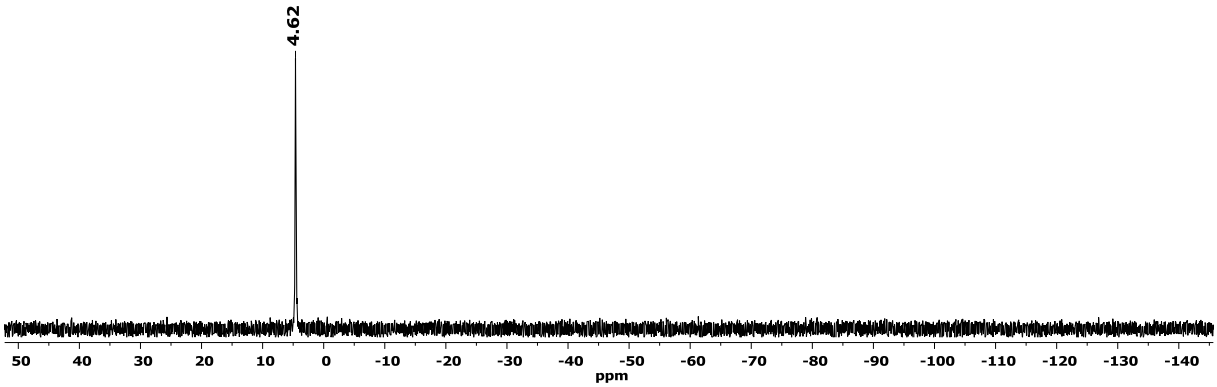


Figura 33: Espectro de RMN ^{31}P para o complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



Para o espectro do complexo, em comparação com o espectro do ligante VMTSC, observa-se um efeito de desblindagem no hidrogênio H9 devido à proximidade com o centro metálico, evidenciada pelo deslocamento do sinal que passou de 11,35 ppm no ligante livre para 11,57ppm no complexo.

A presença do sinal do hidrogênio H20 em 10,52 ppm no espectro do complexo demonstra que não houve a desprotonação do sistema amônio do ligante VMTSC

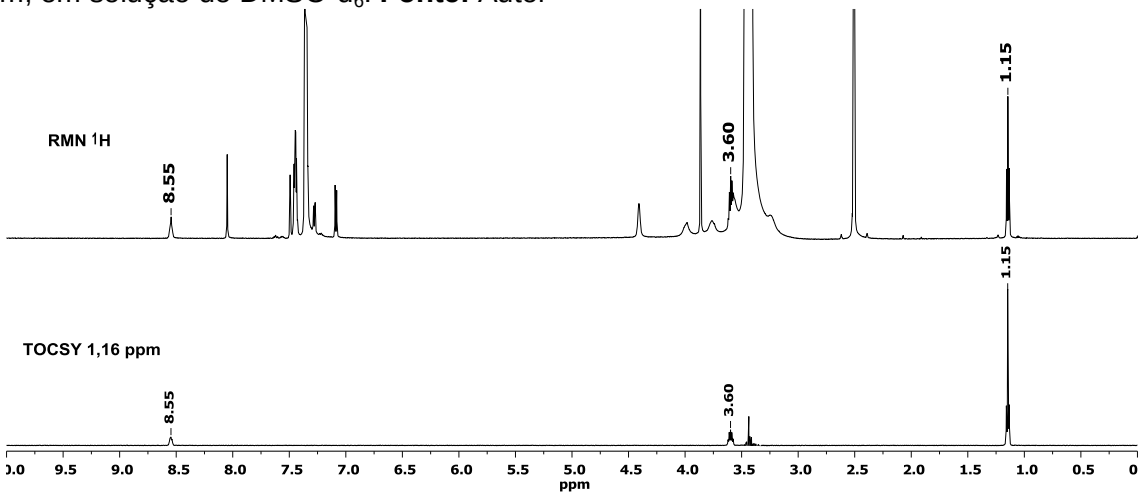
ao coordenar-se ao centro metálico. Além disso, este hidrogênio sofreu um efeito de blindagem após a coordenação, apresentando um deslocamento de seu sinal de 11,15 ppm para 10,52 ppm. Esta condição coincide com o observado no espectro de infravermelho obtido para o complexo, onde houve o deslocamento na banda referente ao estiramento νN-H do grupo R_3N^+-H (2726 cm^{-1}-2250 cm^{-1} corresponde ao sistema amônio) para número de onda menor.

O grupo NH amida da porção tiossemicarbazona (hidrogênio H11), que apresenta um sinal na forma de tripleto na região de 8,48 ppm no ligante livre, sofre um efeito de blindagem no complexo, tendo seu sinal deslocado para 8,55 ppm (J_{1112}= 5,7 Hz). Hidrogênios de grupo amida, pelo efeito quadrupolar do nitrogênio, apresentam sinais alargados e pouco definidos que normalmente ocorre em uma ampla região

O hidrogênio H5 que faz parte do anel aromático da vanilina sofre efeito de desblindangem no complexo formado. Este efeito faz com que o sinal sofra deslocamento para 7,49 ppm. Assim como o hidrogênio H5, os hidrogênios H1 e H2 também sofreram efeito de desblindagem no novo sistema, apresentando deslocamentos químicos equivalentes a 7,28 e 7,09 ppm, respectivamente.

O sinal referente ao hidrogênio imínico H7 apresentou um deslocamento mais pronunciado quando comparado aos hidrogênios do anel aromático da vanilina. No ligante livre o hidrogênio imínico possui deslocameto químico em 7,99 ppm, enquanto no complexo ele apresenta-se em 8,05 ppm. Quanto aos hidrogênios alifáticos, os sinais alargados observados no espectro do ligante livre se tornaram mais definidos em função da coordenação ao centro metálico. Apesar disso, houve a necessidade de outros experimentos unidimensionais para elucidação dos hidrogênios H18, H19, H21, H22, H24 e H26, assim como, no ligante livre. As técnicas utilizadas foram TOCSY (*Total Correlated Spectroscopy*) e NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) Dessa forma, as **Figura 34** e **Figura 35** apresentam os espectros de TOCSY obtidos pela irradiação das regiões em 1,16 e 4,46 e ppm.

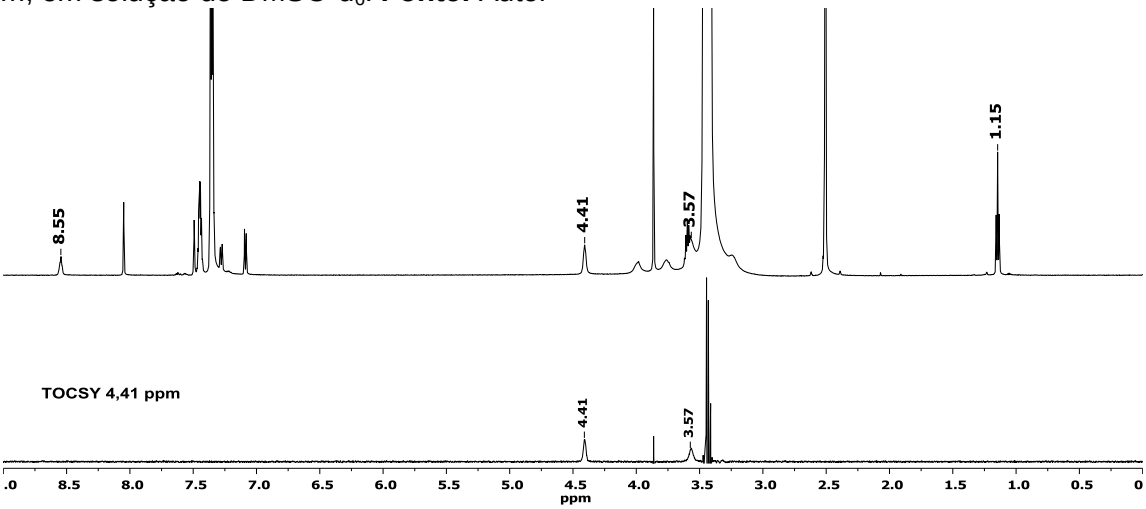
Figura 34: Experimento de TOCSY 1D (14,1 T) para o complexo irradiando o sinal em 1,16 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



A irradiação do tripleto em 1,16 ppm (H13) resultou no aparecimento de dois sinais, um em 8,55 ppm e outro em 3,60 ppm, referentes ao hidrogênio H11 e H12, como esperado. Logo, podemos perceber que os hidrogênios do grupo etil (H12 e H13) não sofreram alterações no ambiente químico com a coordenação, porém, o H11 deslocou de 8,48 ppm para 8,55 ppm devido a proximidade ao centro de coordenação.

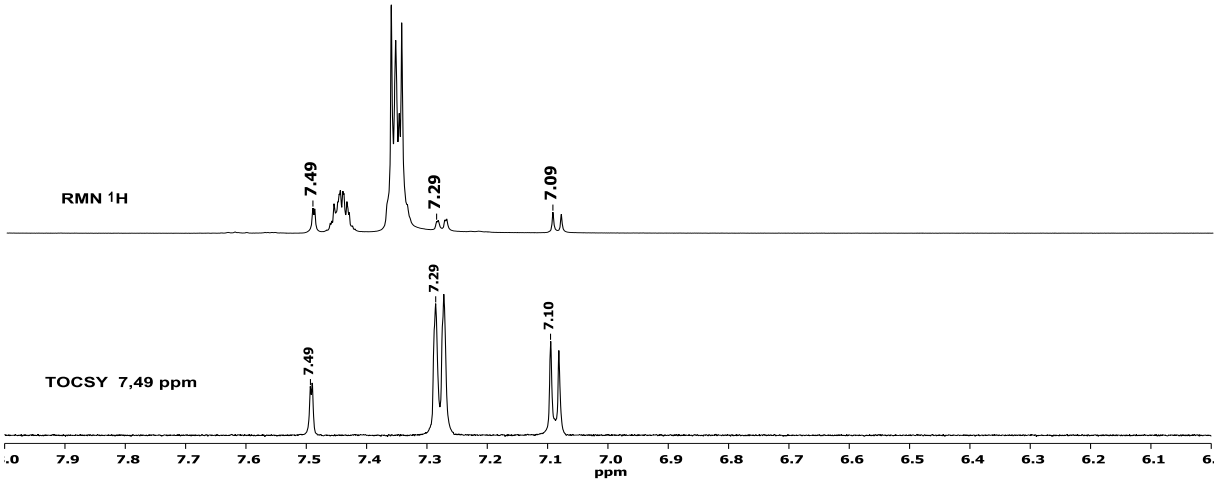
Quando se irradiou o singleto alargado em 4,41 ppm, **figura 35**, houve o aparecimento de um único sinal em 3,56 ppm, referente aos hidrogênios H18 e H19. Esses hidrogênios fazem parte de um sistema de spin isolado, possibilitando assim, sua detecção pela técnica TOCSY 1D, assim como foi feito com o ligante livre.

Figura 35: Experimento de TOCSY 1D (14,1 T) para o complexo irradiando o sinal em 4,41 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



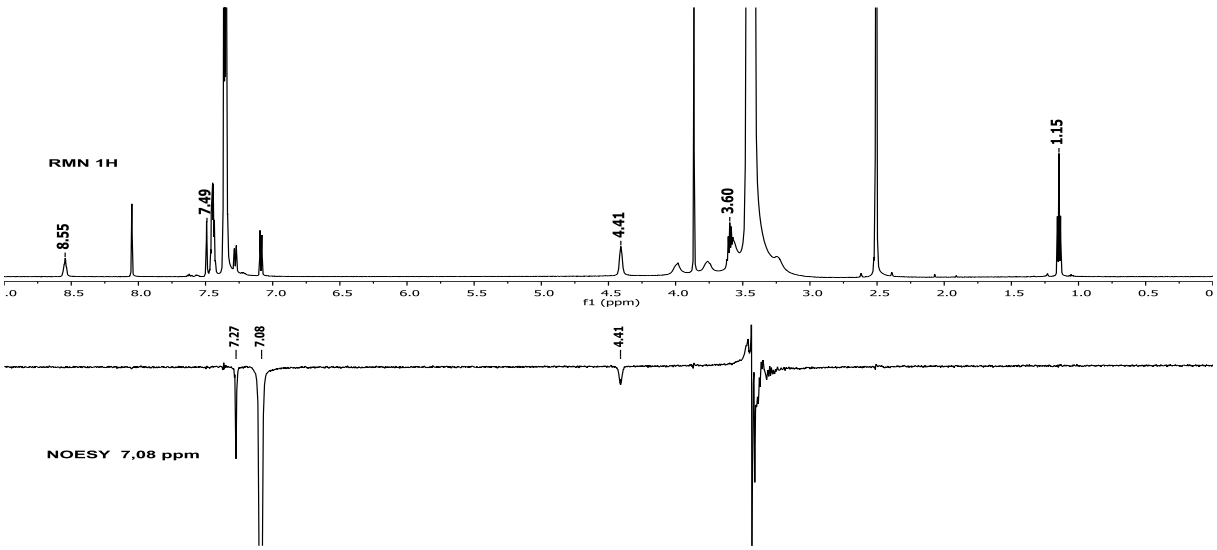
Ao irradiar o duplo dubleto em 7,49 ppm, **Figura 36**, observou-se os sinais que compõe o sistema aromático da vanilina. Logo, os sinais não pertencentes a este sistema de spin pode ser associado aos hidrogênios aromáticos do ligante trifenilfosfina, os quais podem ser confirmados também através da integração de seus sinais.

Figura 36: Experimento de TOCSY 1D (14,1 T) para o complexo com irradiação no sinal em 7,49 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor



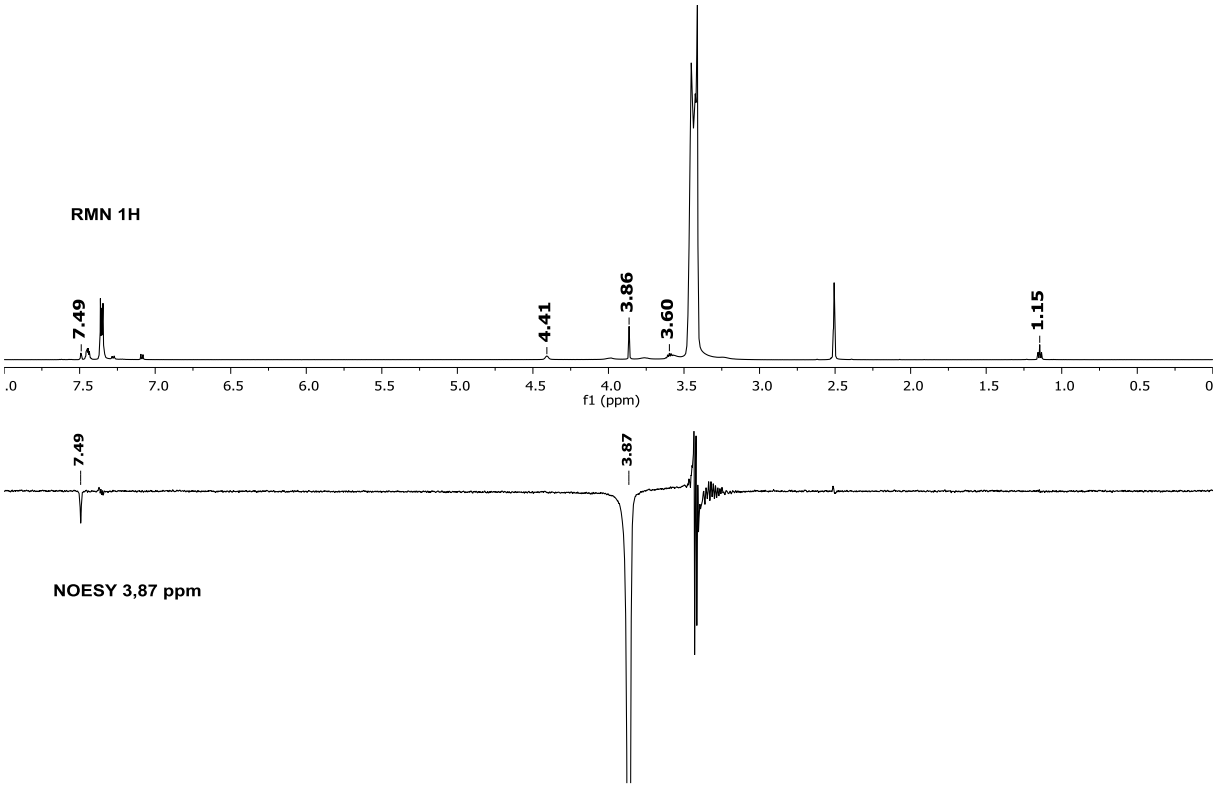
A avaliação do efeito NOE no complexo sob o sinal em 7,08 ppm com o experimento de NOESY 1D realizado, **Figura 37**, confirma a proximidade do H18 do grupo etilmorfolina ao hidrogênio do anel aromático da valina H2, confirmando seu posicionamento espacial, assim como no ligante VMTSC.

Figura 37: Experimento de NOESY 1D (14,1 T) para o complexo com irradiação no sinal em 7,08 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte**: Autor.



O experimento NOESY também foi avaliado sobre o sinal 3,86 ppm, referente ao hidrogênio H16, **Figura 38**. O experimento mostrou que o hidrogênio H16 pertence ao grupo metóxi encontra-se próximo especialmente do hidrogênio H5 (7,49 ppm) pertencente ao anel aromático da vanilina, indicando que o grupo metoxi se encontra posicionado como previsto na **Figura 31**.

Figura 38: Experimento de NOESY 1D (14,1 T) para o complexo com irradiação no sinal em 3,86 ppm, em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.



Diante dos dados adquiridos para complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$], na **Tabela 6** são apresentados os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do complexo e suas constantes de acoplamento.

Tabela 6: Deslocamentos químicos e atribuições dos sinais adquiridos pelos experimentos de RMN ^{1}H para o complexo. **Fonte:** Autor

Posição	δ ^{1}H ppm
1	7,28; *dd*; [1H]; *J* = 2,0 Hz
2	7,09; *d*; [1H]; *J* = 8,3 Hz
5	7,49; *d*; [1H]; *J* = 8,3 Hz e *J* = 2,0 Hz
7	8,05; s; [1H];
9	11,57; s_{al}; [1H]
11	8,55; t_{al}; [1H];
12	3,6; $q_{al;}$ [2H]; *J* = 6 Hz e J=7,1
13	1,15; *t*; [3H]; *J*= 7,1 Hz
16	3,80; *s*; [3H]
18	4,41; t_{al}; [2H];
19	3,56; s_{al}; [2H];
20	10,52; $s_{al;}$ [1H]
21	3,99; s_{al}; [2H];
22	3,55; s_{al}; [2H];
24	3,24; s_{al}; [2H];
25	3,76; s_{al}; [2H];
^{31}P	4,62; *s*
H_{Ph}	7,45-7,36; *m*; [15H]

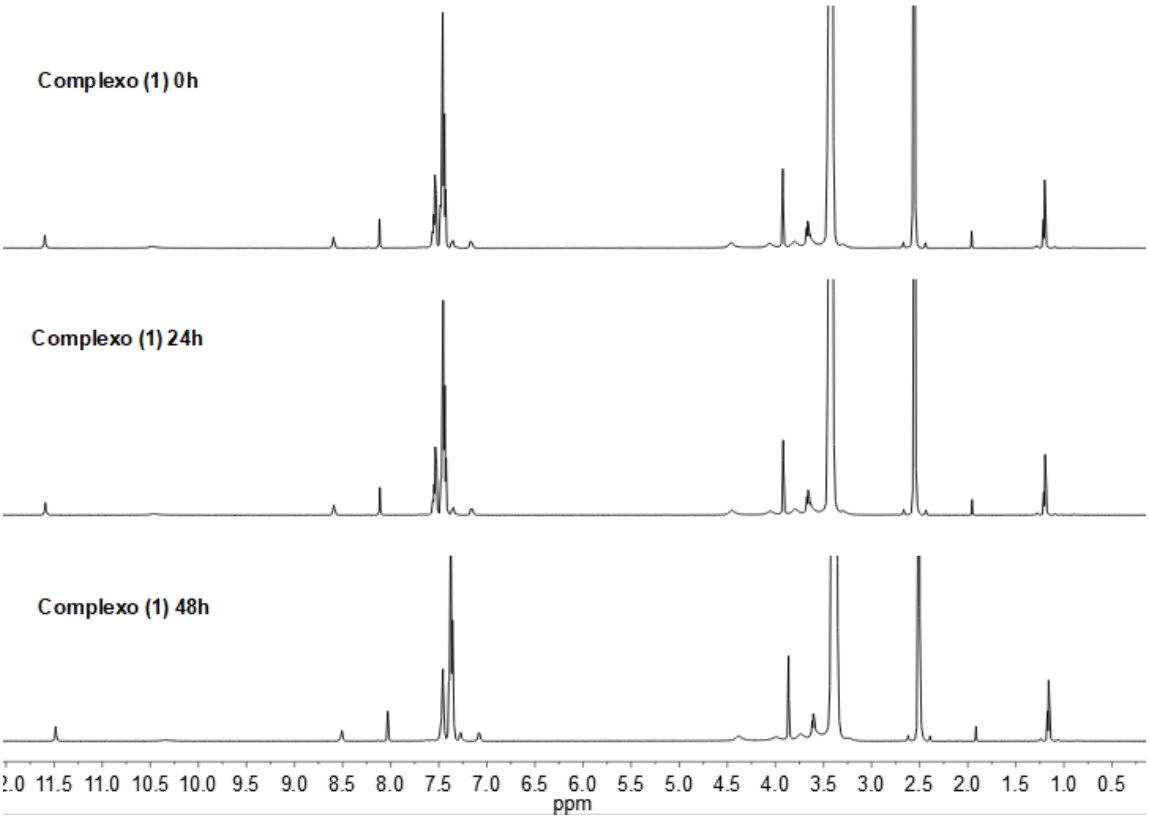
Multiplicidade: s=singleto; d=dupleto; t=tripleto; dd=duplo dubleto; s_{al}: sinal alargado.

4.6 Estabilidade em solução

A estabilidade em solução do complexo de Ag(I) foi avaliada. Foram coletados espectros de RMN ^{1}H em DMSO-d_6 nos tempos de 0, 24 e 48h, tendo em vista o tempo de incubação dos posteriores ensaios de viabilidade celular que serão

realizados. O complexo se mostrou estável no período de tempo avaliado, não sendo observadas alterações significativas no posicionamento dos sinais nos espectros, como pode-se observar na **Figura 39.**

Figura 39: Espectro de RMN ^{1}H coletados nos tempos 0, 24 e 48h para o complexo de Ag(I), (14,1 T), em solução de DMSO-d_6. **Fonte:** Autor.



4.7 Análise estrutural via difração de raios X por monocristal

Cristais viáveis a técnica de cristalização foram obtidos através da lenta evaporação da solução matriz da síntese do complexo. A análise dos monocristais feita por difração de raios X tem por objetivo o estudo dos arranjos espaciais dos átomos que compõe o complexo, portanto, o estudo dos seus respectivos parâmetros geométricos.

A estrutura cristalina resolvida para o complexo, **Figura 40**, confirma o sucesso previsto pelas técnicas espectroscópicas na obtenção do complexo mononuclear de Ag(I). A análise estrutural revelou que o complexo cristalizou em um sistema triclínico com grupo espacial *P-1.* No ambiente de coordenação o átomo de prata

apresenta geometria tetraédrica distorcida comprovada pelos valores de distâncias de ligação da prata aos ligantes que variam entre 2.449(1) e 2.599(2) Å, e pelos ângulos de ligação variando entre 102.71 e 114.73°, **Tabela 7**.

Figura 40: Projeção ORTEP dos complexos mostrando a numeração dos átomos ao redor do centro metálico Ag(I) e dos principais átomos do ligante tiossemicarbazona. **Fonte:** Autor.

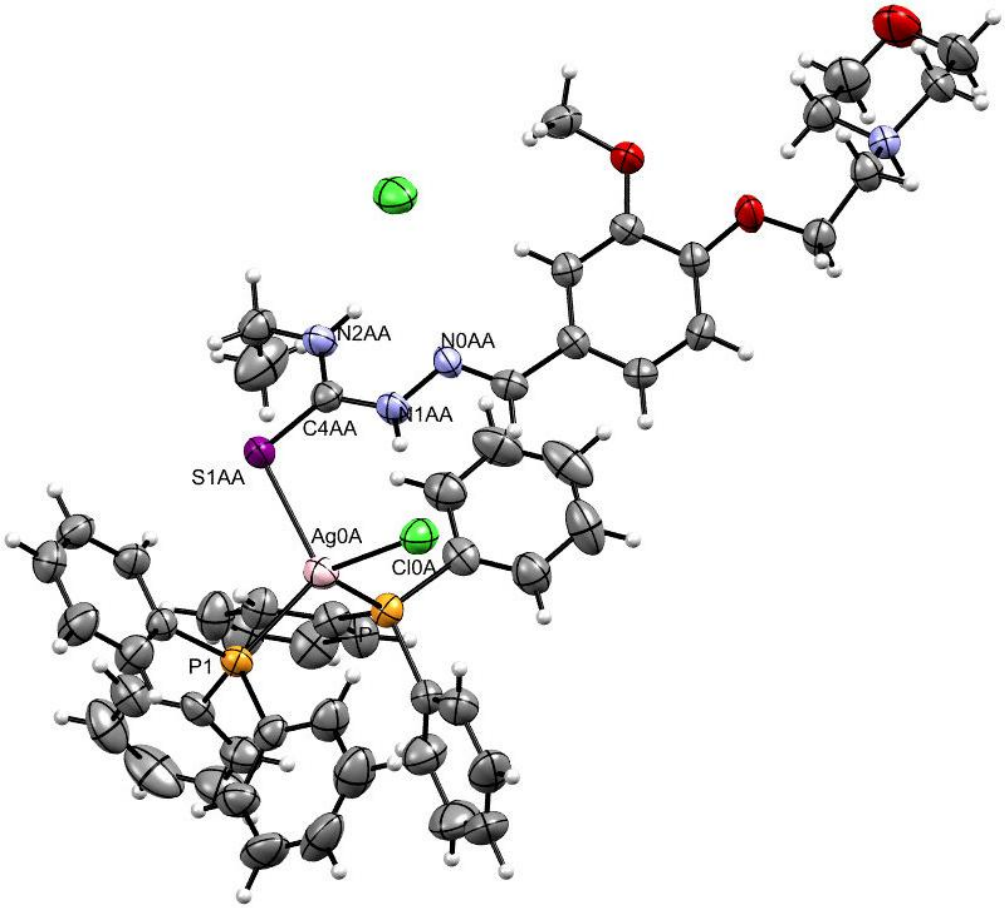


Tabela 7: Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (º) associados ao centro metálico do complexos de prata(I). **Fonte:** autor.

	Distâncias (Å)		Ângulos (º)
Ag_{0A}— P	2.504(1)	$S1_{AA}$— Ag_{0A}—Cl_{0A}	102.71(5)
Ag_{0A}—Cl_{0A}	2.599(2)	Cl_{0A}—Ag_{0A}— P	105.42(5)
Ag_{0A} —$S1_{AA}$	2.594(2)	$S1_{AA}$— Ag_{0A}-—P_1	112.25(5)
Ag_{0A}— P_1	2.449(1)	P_1—Ag_{0A}— P	114.73(5)

A distorção encontrada no tetraedro pode ser atribuída à coordenação de dois ligantes volumosos -as trifenilfosfinas- ao centro metálico, resultando em ângulos ligeiramente maiores do que os esperados para um tetraedro perfeito, logo, maiores do que 109°, causando a distorção. Os ligantes volumosos são coordenados por seus respectivos átomos de fósforo, além deste, temos o átomo de enxofre coordenado ao metal pertencente ao ligante tiossemicazona e um ligante clorido, como ocupantes dos sítios de coordenação do complexo.

No estado sólido, o ligante tiossemicarbazona encontra-se coordenado em sua forma neutra (tiona) via modo S-monodentada, ou seja, com o átomo de *N* hidrazínico protonado. Os principais parâmetros geométricos correspondentes deste ligante estão associados ao grupo imina que apresentou um comprimento de ligação característico de 1.262(9)Å, evidenciando uma ligação dupla (N_{0AA}═C_{1BA}), e o comprimento da ligação simples C_{4AA}—S_{1AA} com valor de 1.690(5)Å, que mostra que a ligação encontra-se com seu caráter s diminuído devido a coordenação, já que tiossemicarbazonas livres apresentam comprimento de ligação C═S em média ≈1,6 Å.

Uma vez que o centro metálico apresenta o estado de oxidação +1 espera-se que a carga do complexo totalize em +1, isso porque o grupo morfolina pertencente à tiossemicarbazona possui o átomo de nitrogênio protonado, o qual esta sendo neutralizado pela carga negativa do contra íon Cl-. Assim, podemos perceber na estrutura interações intermolecular do tipo eletroestática N-H....Cl que fixa sua conformação.

4.8 Avaliação da atividade antiproliferativa

O estudo de complexos em meios de cultura celular humana é um campo bastante complexo e desafiador. Tais estudos são governados não somente pelo valor de PH, como força iônica e potencial redox da solução, assim como, pela presença de proteínas (predominantemente albumina) entre outros quelantes fortes a íons metálicos, que em conjunto reduzem significativamente a citotoxicidade de íons metálicos.

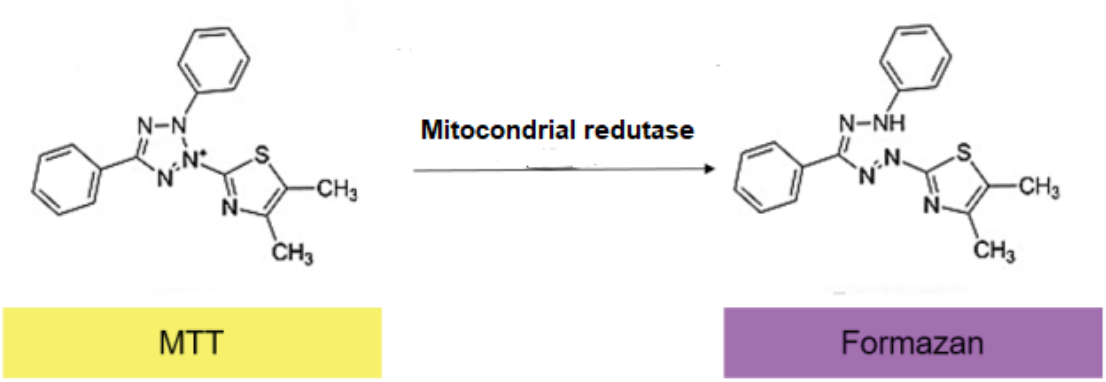
O mecanismo de ação dos compostos de prata(I), apesar de não estar totalmente elucidado, é associado a biodisponibilidade do íon Ag^+ ao meio biológico, o qual acaba sendo prejudicado devido a sua precipitação na presença de íon Cl^- no meio de cultura de células, além de interações com proteínas existentes. No entanto,

a baixa citotoxicidade desse metal ao ser humano é o que o torna vantajoso no desenvolvimento de medicamentos.

Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular *in vitro* busca testar a atividade citotóxica de diversos compostos frente a diferentes linhagens celulares. Neste contexto, o ensaio de MTT (3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H tetrazólio) é um dos métodos colorimétricos mais populares para quantificar densidades celulares, uma vez que é seguro, simples, de baixo custo, e adequado para várias linhas de células animais [73].

O ensaio de MTT dependente da capacidade das células viáveis de metabolizar o sal de tetrazólio (coloração amarela) solúvel em água em um produto, cristais de formazan, insolúvel em água de coloração roxa **Figura 41**. O ensaio de MTT mede a viabilidade celular em termos de atividade redutiva que ocorrem na mitocôndria de células vivas, embora agentes redutores e enzimas localizadas em outras organelas, como o retículo endoplasmático, também estejam envolvidos.

Figura 41: Redução da enzima MTT em Formazan. **Fonte:** Adaptado de [79].



Dessa forma, ensaios de MTT foram realizados em parceria com o professor Fillipe Vieira Rocha da UFScar (Universidade Federal de São Carlos) para o complexo de prata(I) e seu respectivo ligante tiossemicarbazona. A viabilidade celular foi determinada após 4 horas de incubação dos compostos com o sal de tetrazólio, os cristais formazan formados foram solubilizados com o auxílio de Álcool Isopropílico e DMSO e a absorbância desta solução colorida quantificada por um espectrofotômetro.

A viabilidade celular foi avaliada frente às seguintes linhagens celulares humanas: A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), A549 (tumoral de pulmão), HepG2 (tumoral de fígado), MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativo) e MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal). E seus valores representados através do IC_{50}, concentração necessária para inibição de 50 % do crescimento celular, **Tabela 8**. Os ensaios também foram realizados com o metalofármaco cisplatina nas mesmas condições experimentais, como um composto referência.

Tabela 8: Valores de IC50 (μM) do complexo de prata(I) e de seu respectivo ligante tiossemicarbazona., **Fonte:** Autor.

	IC_{50} (μM)				
Composto	**A2780cis**	**A549**	**HepG2**	**MDA-MB-231**	**MRC5**
M1	0,428 ± 0,008	1,779 ± 0,201	12,440 ± 1,033	1,113 ± 0,098	7,027 ± 0,090
VMTSC	>50	1,82 ± 0,10	>50	>50	>100
Cisplatina	25,087 ± 0,891	4,97 ± 0,32	19,633 ± 0,660	67,0 ± 1,06	11,74 ± 1,20

Considerando que compostos que apresentam valores de IC_{50} menores do que 10 μM para linhagens tumorais são considerados promissores. Neste contexto, o complexo $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]$ apresentou atividade antiproliferativa promissora para praticamente todas as linhagens celulares testadas. O mesmo não ocorreu para o ligante VMTSC que apresentou potencial antitumoral apenas para a linhagem de pulmão A549. Dessa forma, podemos associar a potencial ação inibitória do complexo frente às linhagens tumorais ao efeito da coordenação.

O complexo apresentou um maior efeito inibitório frente à linhagem A2780cis, tumoral de ovário, com IC_{50} de 0,428 ± 0,008 μM. O que caracteriza uma atividade bem promissora, relevantemente melhor do que a cisplatina que apresentou um valor de IC_{50} de 25,087 ± 0,891 μM, ou seja, uma ação inibitória frente a uma linhagem tumoral com resistência à cisplatina.

Em relação à linhagem tumoral de mama triplo-negativo, MDA-MB-23, o complexo apresentou valor de IC_{50} de 1,113 ± 0,098 μM. O complexo se mostrou mais ativo frente ás células do que o composto protótipo, IC50 6,72 ± 0,46 μM; demonstrando que a substituição do átomo de -H no ligante tiossemicarbazona pelo grupo etil afeta o potencial inibitório do complexo.

Além desta, o complexo apresentou atividade satisfatória frente à linhagem tumoral de pulmão, A549, com valor de IC_{50} de 1,779 ± 0,201 μM, também testada para o composto protótipo, o qual apresentou valor de IC_{50} 8,15 ± 1,21 μM. E linhagem tumoral de fígado, HepG2 (12,440 ± 1,033 μM), o qual apresentou maior valor de IC50 entre as linhagens testadas. Vale ressaltar que para todas as linhagens testadas o complexo se mostrou mais ativo que o fármaco cisplatino que atualmente trata-se de um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia, seja de forma única ou combinada com demais fármacos.

Embora o mecanismo de ação dos agentes antitumoral à base de prata não seja totalmente elucidado, é reconhecido que sua ação antitumoral é baseada em mecanismos diferentes em comparação com os derivados da platina, em termos de sua interação com o DNA e direcionamento da membrana mitocondrial. O que o torna uma promissora alternativa aos tradicionais complexos de platina.

4.9 Ensaios preliminares de interação com o DNA

Como visto anteriormente, devido às características das células tumorais os ácidos nucleicos (DNA) são alvos moleculares cruciais aos candidatos a metalofármacos. Portanto, a investigação da interação desses complexos metálicos ao DNA é de suma importância para o esclarecimento do modo de ação desses candidatos a fármacos.

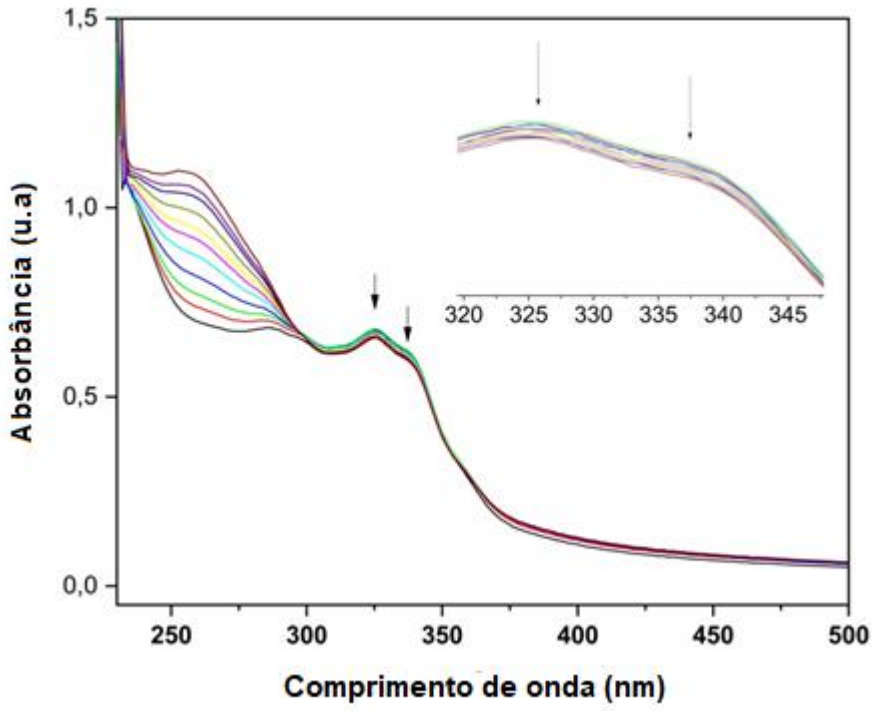
Em geral, os compostos podem interagir com o DNA via ligações covalentes (intra/inter-ligação cruzada e alquilação) e via ligação não covalente, tais como intercalação, interações nos sulcos menores e maiores, e eletrostáticas [74]. Em geral, pequenas moléculas se ligam ao DNA e alteram/inibem o seu funcionamento promovendo a morte das células de rápida proliferação.

Diferentes técnicas analíticas vêm sendo utilizadas neste campo, como espectrometria UV-Vis, espectrometria de fluorescência, cromatográficas, eletroquímicas, dentre outras[74] [75]. A espectrometria de absorção UV-Visível fornece informações sobre o estado fundamental médio da molécula absorvente e talvez seja a técnica instrumental mais comumente utilizada para o estudo preliminar da interação entre pequenas moléculas com o DNA [76].

As bases heteroaromáticas presentes nos ácidos nucleicos absorvem fortemente a luz UV abaixo de 300 nm fornecendo informações sobre o estado fundamental médio da molécula absorvente. Assim, Mudanças na absorção do fármaco ou do DNA nesta região do espectro eletromagnético são fortes indícios da ocorrência de interações. Experimentos de titulação monitorada por UV-vis de quantidade fixa do composto após sucessivas adições de concentrações crescentes do DNA produzem mudanças na estrutura como resultado da interação [76].

Dessa forma, para avaliar a afinidade do complexo de prata pelo DNA, espectros de UV-Vis foram registrados na ausência e presença de concentrações crescentes do ctDNA (0 – 60 µM), **Figura 42**. ctDNA trata-se do DNA livre de mamífero que encontra-se na estrutura B-DNA, conformação do DNA observada com maior frequência [77].

Figura 42: Espectros de Uv-vis do complexo de prata M1 em tampão tris-HCl (pH 7,4) na presença de quantidades crescentes de ctDNA. **Fonte:** Autor.



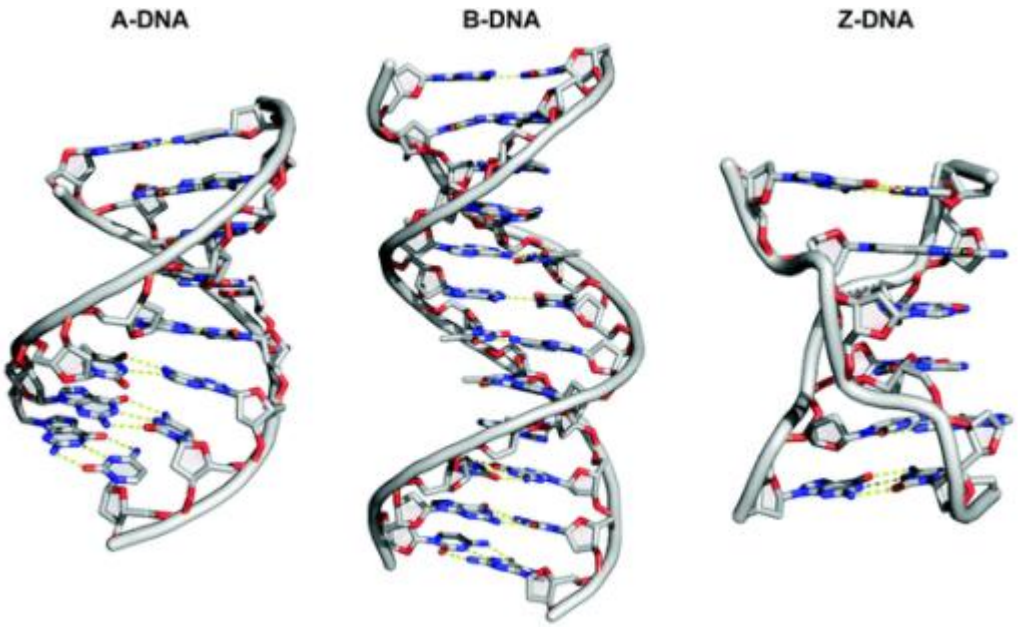
Após a adição do ctDNA *(calf thymus)* a solução do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$]Cl houve um efeito hipocrômico, responsável pela diminuição da absorbância da banda. Grupos intercaladores são comumente responsáveis pelo efeito hipocrômico em espectros de UV-vis de DNA, isso ocorre devido à combinação do elétron do composto com os elétrons da base do DNA, diminuindo a probabilidade de transição eletrônica, o que resulta em um decréscimo da absorbância [78]. Como a estrutura do complexo não justifica uma interação por intercalação por não haver em sua estrutura anéis conjugados é proposto que grupos aminas –NH- presentes na estrutura do complexo formem ligações de hidrogênio, já que o DNA possui vários sítios de ligação de hidrogênio que são acessíveis tanto no sulco menor quanto no maior, levando a uma interação hidrofóbica fraca com os pares de bases no DNA. Contudo, a taxa de hipocromismo associado à interação foi menor que 5% e, portanto, não foi possível determinar o valor da constante de ligação K_b (equação de Benesi-Hildebrand). Evidenciando a natureza fraca dessa interação.

Diante da fraca interação entre o complexo de prata e o DNA, outros experimentos como o Dicroísmo circular (CD) e ensaios de competição com moléculas específicas foram realizadas no intuito de entender melhor o sistema.

O dicroísmo circular (CD) trata-se uma técnica espectroscópica que mede a diferença na absorbância da luz polarizada circularmente à esquerda e à direita, uma ferramenta biofísica muito sensível e bem estabelecida na caracterização estruturais de biopolímeros, como proteínas e ácidos nucléicos [79]. Portanto, os espectros de CD nos fornece informações importantes sobre as interações do complexos com o DNA.

O DNA tem estrutura helicoidal dupla, cuja conformação é derivada de vários fatores, como composição de suas bases e parâmetros ambientais (pH do tampão, força iônica, polaridade ou temperatura) [80]. Apesar do DNA possuir inúmeras conformações identificadas, incluindo: A-DNA, Z-DNA, DNA triplex, G-quadruplex, entre outras; suas conformações, em média, representam meramente variantes da conformação do DNA do tipo B, forma predominante do DNA celular [14], **Figura 43**. Assim, o DNA utilizado para obtenção do espectro de CD encontra-se na forma B que é caracterizado por duas bandas típicas, uma banda de comprimento de onda longa positiva em cerca de 260-280 nm e uma banda negativa em torno 245 nm, essas bandas são consideradas altamente sensíveis à interação de pequenas moléculas com o DNA.

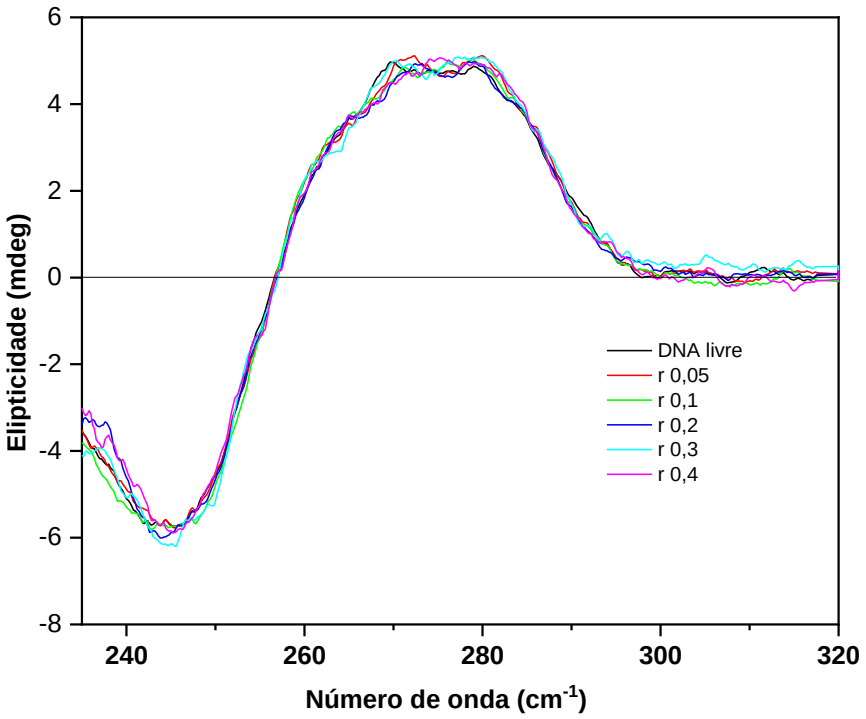
Figura 43: Estruturas de raios-X de A-, B- e Z-DNA dos arquivos PDB 1VJ4, 1BNA e 2DCG respectivamente. **Fonte:** [77]



CD é tipicamente usado para determinar o modo de ligação preferencial dentro do ambiente do DNA, por exemplo, sulco menor, sulco maior e intercalação. Os ligantes de sulcos menores não perturbam significativamente o perfil CD do DNA, no entanto, na intercalação tanto as bandas positivas quanto as negativas são alteradas significativamente [81] [82].

O espectro obtido do CD do DNA na ausência e presença do complexo de prata(I), **Figura 44**, conforme podemos observar, mostra que Tal interação pode ser resultado de ligações nos sulcos ou interação eletrostáticas, já que estas não alteram de forma significativa o espectro do DC. [82].

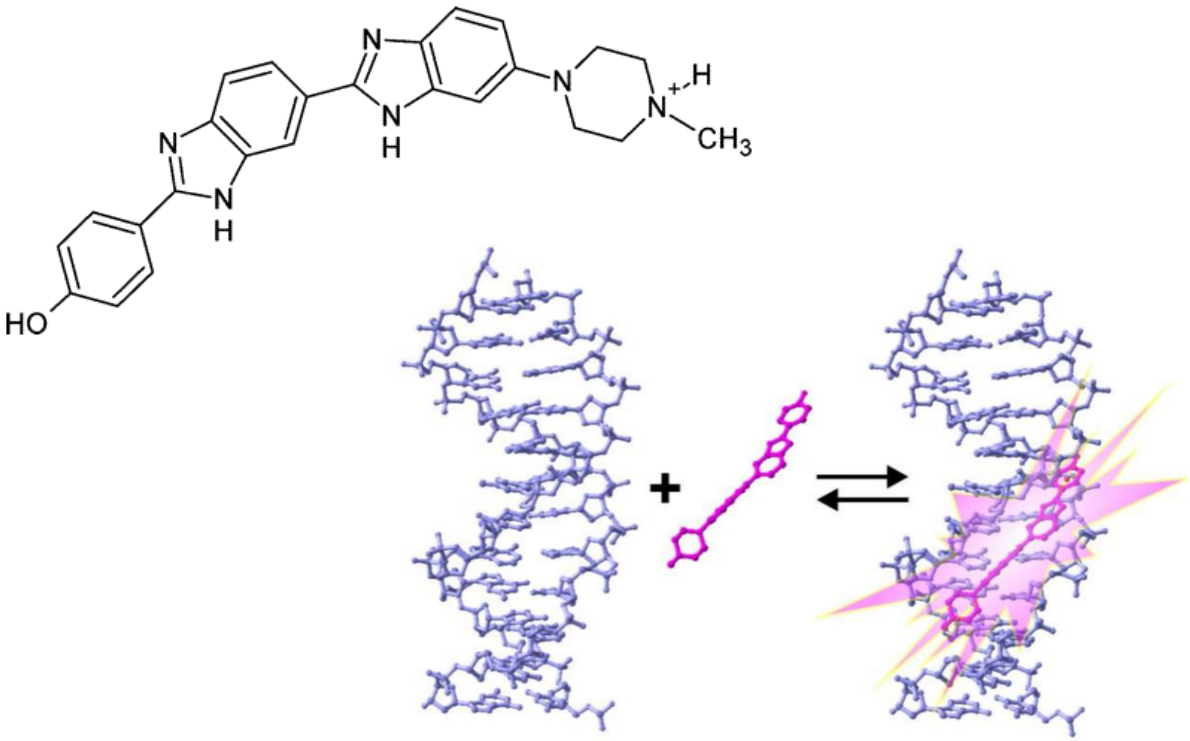
Figura 44: Espectros de CD do DNA livre e na presença do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] em tampão tris-HCl. **Fonte:** Autor.



Assim, para uma maior compreensão das interações do complexo com o DNA ensaios de ligação competitiva foram realizados. O corante Hoechst 33258, 2'-(4-hidroxifenil)-5-[5-(4-metilpiperazina-1-il)benzimidazol-2-il]bezimidazol, é um derivado sintético de bis(benzimidazol) que tem sido amplamente utilizado como um corante de DNA fluorescente [83]. Hoechst 33258 liga-se fortemente ao sulco menor do DNA, **Figura 45**, e exibe uma intensa fluorescência quando ligado ao DNA, sendo

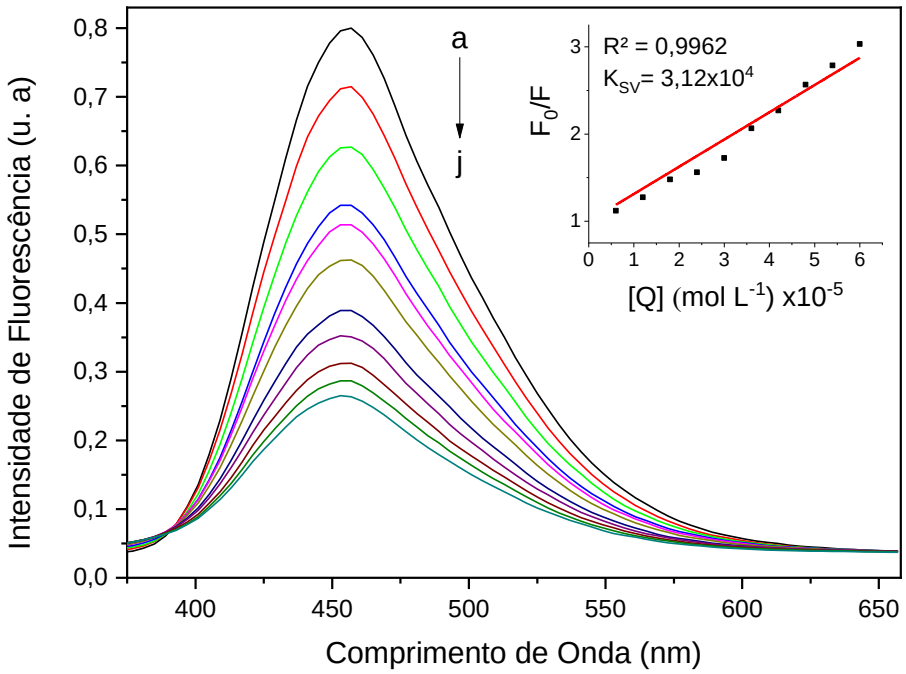
aproximadamente 30 vezes mais intenso que o ligante livre, garantindo assim, uma boa relação sinal-ruído[84]. Quando uma molécula pequena consegue deslocar o corante já ligado ao DNA irá interagir com ele da mesma forma que o corante deslocado. Assim, a mudança no comportamento fluorescente do DNA-Hoechst poderá ser atribuída ao deslocamento do Hoechst do sulco menor da hélice de DNA, resultando em rendimento fluorescente reduzido [82].

Figura 45: Estrutura do Hoechst 33258 e a representação da ligação do Hoechst 33258 ao sulco menor do B-DNA. **Fonte:** [78]



Os espectros de emissão do aduto Hoechst-ctDNA na presença de concentrações crescentes do complexo [AgCl(VMTSC)(PPh_3)$_2$] é apresentado na **Figura 46**. Como pode ser observado, a intensidade de emissão do Hoechst-DNA em 458 nm diminuiu em aproximadamente 69% após adições sucessivas do complexo de prata, evidenciando assim, que o composto pode se ligar ao DNA e deslocar o Hoechst 33258 do sulco menor. Nosso resultado demonstra que, apesar do complexo conseguir deslocar o Hoechst 33258, a ligação entre o complexo e o ctDNA é mais fraca do que a do Hoechst-DNA, pois, mesmo na presença de um excesso do composto de prata a fluorescência do aduto Hoechst-ctDNA não é completamente suprimida.

Figura 46: Espectro de emissão do complexo Hoechst-ctDNA na presença do complexo de prata (6 – 60 µM) em tampão tris-HCl (pH 7,4). **Fonte:** Autor



5. CONCLUSÃO

Mediante os dados de caracterizações espectroscópica no estado sólido e em solução podemos concluir que um composto inédito de prata (I), [AgCl(VMTSC)(PPh3)2] , foi obtido com alto rendimento e alta pureza, assim como seu respectivo ligante tiossemicarbazona (VMTSC).

Estudos por difração de raios X confirmou a obtenção do complexo com átomo central tetracoordenado, assim como previsto pelas técnicas espectroscópicas. Portanto, a prata(I) encontra-se coordenada ao ligante tiossemicabazona de maneira monodentada via átomo de enxofre, aos ligantes trifenilfosfina através do fósforo e pelo ligante clorido, constituindo uma geometria tetraédrica distorcida.

Estudo de estabilidade química em solução nos tempos de 0, 24 e 48h demonstrou que o complexo [AgCl(VMTSC)(Pph3)2] é estável em solução, que em conjunto com sua alta pureza, possibilitou a realização de experimentos biológicos.

Observando os resultados de IC_{50}, concentração inibitória média, verificou-se que a substituição do grupo –H no complexo protótipo pelo grupo $–CH_2CH_3$, potencializou a atividade antitumoral frente à linhagem de câncer de mama triplo negativo, MDA-MB-231, como esperado. Esta tendência pode ser explicada pelo

grupo etil ser um grupo lipofílico, e consequentemente promover uma melhor interação com a membrana celular. Além desta linhagem, também houve resultados promissores com outras 5 linhagens celulares o que confirma a extensa atividade antiproliferativa do complexo.

Estudos de interação com o DNA demonstraram que o complexo é capaz de interagir com essa biomolécula. O ensaio de titulação espectroscópica UV-Vis, demonstrou que a interação entre o complexo e o DNA é fraca, já que a constante de interação K_b não pode ser determinada. Na técnica de dicroísmo circular o complexo conseguiu interagir com a estrutura de B-DNA de maneira fraca, como demonstrado em seu respectivo espectro. O ensaio de competição com o Hoechst 33258 mostrou que o complexo interage o suficiente com o DNA á ponto de deslocar uma quantidade significativa do Hoescht ligado, embora isso não ocorra de forma completa. Contudo, estes podem não ser o único modo de ação deste complexo, necessitando assim, de outros testes de competição para estudar outros sítios de ação do complexo a estrutura do DNA.

Embora o DNA seja um alvo do complexo, estudos utilizando o composto protótipo indicam as mitocôndrias como um potencial alvo intracelular ao invés do DNA, o que introduz a perspectiva de novos ensaios visando à investigação deste comportamento. Além de alvos biológicos diferente destes que sejam responsáveis por desencadear efeitos citotóxicos.

A vista do que foi exposto, considerando as propriedades evidenciadas, os resultados desse trabalho demonstraram que o composto de prata(I) $[AgCl(VMTSC)(PPh_3)_2]$ pode ser um potencial e importante agente no combate ao câncer. Não apenas no tratamento de câncer de mama triplo negativo, como no de pulmão, fígado e ovário com resistência à cisplatina.

6. Referências

1. Instituto Nacional do Cancer I. O que é câncer? In; 2021.
2. Instituto Nacional do Cancer I. o que causa o câncer? In; 2021.
3. de Almeida LC, Calil FA, Machado-Neto JA, Costa-Lotufo LV. DNA damaging agents and DNA repair: From carcinogenesis to cancer therapy. *Cancer Genetics* 2021,**252-253**:6-24.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K*, et al. Biologia Molecular da Célula*. 6 ed; 2017.
5. Instituto Nacional do Cancer I. Como surge o cancer. In; 2021.
6. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. *MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)* 2020:122.
7. Câncer. In. Organização Mundial de Saúde; 2021.
8. Sikes RA. Chemistry and pharmacology of anticancer drugs. *British Journal of Cancer* 2007,**97**:1713-1713.
9. thurston D. *chemistry and pharmacology of anticancer drugs*. 1 ed. CRC Press; 2006.
10. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 2012,**9**:193-199.
11. Brunton; LL, Chabner; BA, Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12 ed; 2012.
12. Becker J, Nardin JM. Antiemetics utilization in antineoplastic treatment of oncologic patients. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde* 2019,**2**:1.
13. Orvig C, Abrams MJ. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev* 1999,**99**:2201-2204.
14. Shukla MK, Leszczynski J. Nucleic Acids: Ground-State and Excited-State Properties, Structures, and Interactions and Environmental Aspects as Revealed by Computational Studies. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*: Elsevier; 2014.
15. Bruijnincx PC, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol* 2008,**12**:197-206.
16. Guo Z, Sadler PJ. Metals in Medicine. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999,**38**:1512-1531.
17. Storr T, Thompson KH, Orvig C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews* 2006,**35**:534-544.
18. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 1999,**99**:2467-2498.
19. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Zoroddu MA. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews* 2015,**284**:329-350.
20. Harper BW, Krause-Heuer AM, Grant MP, Manohar M, Garbutcheon-Singh KB, Aldrich-Wright JR. Advances in platinum chemotherapeutics. *Chemistry* 2010,**16**:7064-7077.
21. Hannon MJ. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry* 2007,**79**:2243-2261.
22. Guo Z, Sadler PJ. Metals in Medicine. 1999.
23. Oommen D, Yiannakis D, Jha AN. BRCA1 deficiency increases the sensitivity of ovarian cancer cells to auranofin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2016,**784-785**:8-15.
24. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* 2008,**74**:2171-2178.
25. Medici S, Peana M, Crisponi G, Nurchi VM, Lachowicz JI, Remelli M*, et al.* Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coordination Chemistry Reviews* 2016,**327-328**:349-359.
26. Hecel A, Kolkowska P, Krzywoszynska K, Szebesczyk A, Rowinska-Zyrek M, Kozlowski H. Ag+ Complexes as Potential Therapeutic Agents in Medicine and Pharmacy.

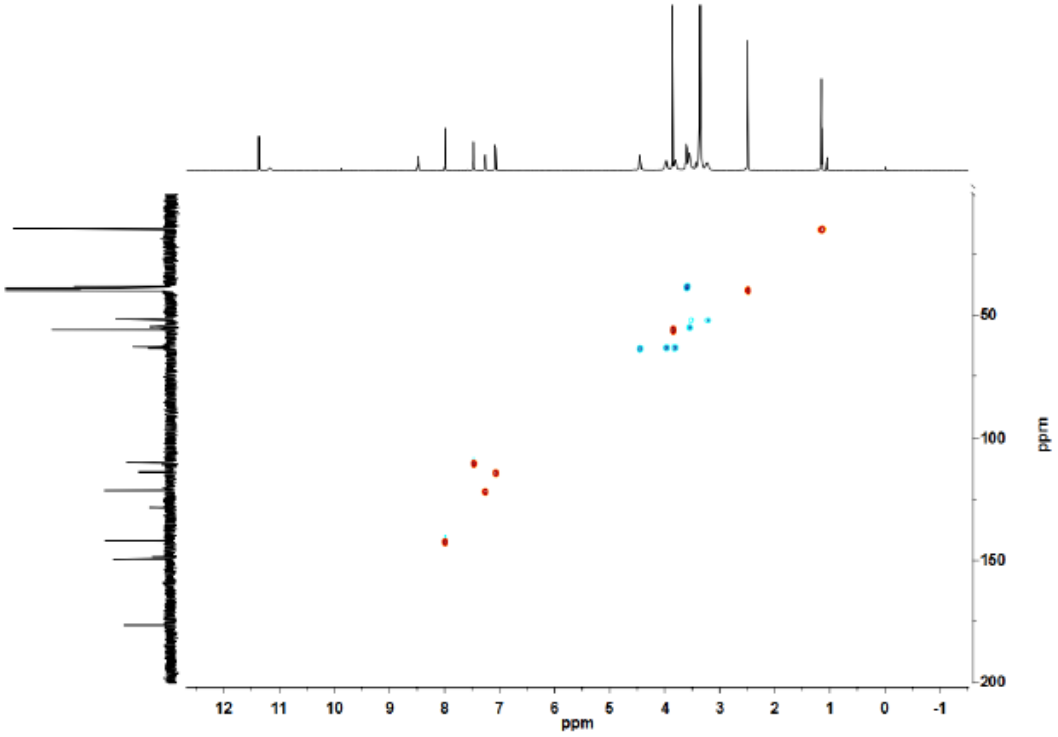
27. Yilmaz VT, Gocmen E, Icsel C, Cengiz M, Susluer SY, Buyukgungor O. Synthesis, crystal structures, in vitro DNA binding, antibacterial and cytotoxic activities of new di- and polynuclear silver(I) saccharinate complexes with tertiary monophosphanes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014,**131**:31-42.
28. Rosenkranz Hs Fau - Rosenkranz S, Rosenkranz S. Silver sulfadiazine: interaction with isolated deoxyribonucleic acid.
29. Guarra F, Pratesi A, Gabbiani C, Biver T. A focus on the biological targets for coinage metal-NHCs as potential anticancer complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2021,**217**.
30. Betts HD, Whitehead C, Harris HH. Silver in biology and medicine: opportunities for metallomics researchers. *Metallomics* 2021,**13**.
31. Banti CN, Giannoulis AD, Kourkoumelis N, Owczarzak AM, Poyraz M, Kubicki M*, et al.* Mixed ligand-silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics* 2012,**4**:545-560.
32. Poyraz M, Banti CN, Kourkoumelis N, Dokorou V, Manos MJ, Simčič M*, et al.* Synthesis, structural characterization and biological studies of novel mixed ligand Ag(I) complexes with triphenylphosphine and aspirin or salicylic acid. *Inorganica Chimica Acta* 2011,**375**:114-121.
33. Lobana TS, Rekha R, Butcher RJ, Castineiras A, Bermejo E, Bharatam PV. Bonding trends of thiosemicarbazones in mononuclear and dinuclear copper(I) complexes: syntheses, structures, and theoretical aspects. *Inorg Chem* 2006,**45**:1535-1542.
34. Yousef TA, Abu El-Reash GM, Al-Jahdali M, El-Rakhawy EBR. Structural and biological evaluation of some metal complexes of vanillin-N-4-(2-pyridyl) thiosemicarbazone. *Journal of Molecular Structure* 2013,**1053**:15-21.
35. Haribabu J, Subhashree GR, Saranya S, Gomathi K, Karvembu R, Gayathri D. Isatin based thiosemicarbazone derivatives as potential bioactive agents: Anti-oxidant and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure* 2016,**1110**:185-195.
36. Pelosi G, Bisceglie F, Bignami F, Ronzi P, Schiavone P, Re MC*, et al.* Antiretroviral Activity of Thiosemicarbazone Metal Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010,**53**:8765-8769.
37. Kang IJ, Wang LW, Hsu TA, Yueh A, Lee CC, Lee YC*, et al.* Isatin-beta-thiosemicarbazones as potent herpes simplex virus inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011,**21**:1948-1952.
38. Dobek AS, Klayman DL, Dickson ET, Jr., Scovill JP, Tramont EC. Inhibition of clinically significant bacterial organisms in vitro by 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Antimicrob Agents Chemother* 1980,**18**:27-36.
39. Klayman DL, Bartosevich JF, Griffin TS, Mason CJ, Scovill JP. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 1979,**22**:855-862.
40. Enyedy EA, May NV, Pape VFS, Heffeter P, Szakacs G, Keppler BK*, et al.* Complex formation and cytotoxicity of Triapine derivatives: a comparative solution study on the effect of the chalcogen atom and NH-methylation. *Dalton Transactions* 2020,**49**:16887-16902.
41. Hager S, Pape VFS, Posa V, Montsch B, Uhlik L, Szakacs G*, et al.* High Copper Complex Stability and Slow Reduction Kinetics as Key Parameters for Improved Activity, Paraptosis Induction, and Impact on Drug-Resistant Cells of Anticancer Thiosemicarbazones. *Antioxidants & Redox Signaling* 2020,**33**:395-414.
42. Murren J, Modiano M, Clairmont C, Lambert P, Savaraj N, Doyle T*, et al.* Phase I and pharmacokinetic study of triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, administered daily for five days in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* 2003,**9**:4092-4100.
43. Vardanyan R, Hruby V. Chapter 28 - Antineoplastic Agents. In: *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Edited by Vardanyan R, Hruby V. Boston: Academic Press; 2016. pp. 495-547.
44. Tenório RP, Góes AJS, Lima JGd, Faria ARd, Alves AJ, Aquino TMd. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova* 2005,**28**:1030-1037.

45. Kallus S, Uhlik L, van Schoonhoven S, Pelivan K, Berger W, Enyedy EA*, et al.* Synthesis and biological evaluation of biotin-conjugated anticancer thiosemicarbazones and their iron(III) and copper(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2019,**190**:85-97.
46. Beebe SJ, Celestine MJ, Bullock JL, Sandhaus S, Arca JF, Cropek DM*, et al.* Synthesis, characterization, DNA binding, topoisomerase inhibition, and apoptosis induction studies of a novel cobalt(III) complex with a thiosemicarbazone ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2020,**203**:110907.
47. Riddell IA, Agama K, Park GY, Pommier Y, Lippard SJ. Phenanthriplatin Acts As a Covalent Poison of Topoisomerase II Cleavage Complexes. *ACS Chemical Biology* 2016,**11**:2996-3001.
48. Legina MS, Nogueira JJ, Kandioller W, Jakupec MA, González L, Keppler BK. Biological evaluation of novel thiomaltol-based organometallic complexes as topoisomerase IIα inhibitors. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2020,**25**:451-465.
49. Kalinowski DS, Yu Y, Sharpe PC, Islam M, Liao YT, Lovejoy DB*, et al.* Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J Med Chem* 2007,**50**:3716-3729.
50. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2009,**9**:691-700.
51. Lindemann A, Patel AA, Silver NL, Tang L, Liu ZY, Wang L*, et al.* COTI-2, A Novel Thiosemicarbazone Derivative, Exhibits Antitumor Activity in HNSCC through p53-dependent and -independent Mechanisms. *Clinical Cancer Research* 2019,**25**:5650-5662.
52. Bormio Nunes JH, Hager S, Mathuber M, Pósa V, Roller A, Enyedy ÉA*, et al.* Cancer Cell Resistance Against the Clinically Investigated Thiosemicarbazone COTI-2 Is Based on Formation of Intracellular Copper Complex Glutathione Adducts and ABCC1-Mediated Efflux. *Journal of Medicinal Chemistry* 2020,**63**:13719-13732.
53. Guo ZL, Richardson DR, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Tan-Un KC, Chan GCF. The novel thiosemicarbazone, di-2-pyridylketone 4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone (DpC), inhibits neuroblastoma growth in vitro and in vivo via multiple mechanisms. *Journal of Hematology & Oncology* 2016,**9**.
54. Demoro B, Caruso F, Rossi M, Benítez D, Gonzalez M, Cerecetto H*, et al.* Risedronate metal complexes potentially active against Chagas disease. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2010,**104**:1252-1258.
55. Renfrew AK. Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics* 2014,**6**:1324-1335.
56. Lobana TS, Sharma R, Bawa G, Khanna S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals-An overview. *Coordination Chemistry Reviews* 2009,**253**:977-1055.
57. Qi JX, Qian K, Tian L, Cheng Z, Wang YH. Gallium(III)-2-benzoylpyridine-thiosemicarbazone complexes promote apoptosis through Ca2+ signaling and ROS-mediated mitochondrial pathways. *New Journal of Chemistry* 2018,**42**:10226-10233.
58. Nath NS, Bhattacharya I, Tuck AG, Schlipalius DI, Ebert PR. Mechanisms of phosphine toxicity. *J Toxicol* 2011,**2011**:494168.
59. Berners-Price SJ, Sadler PJ. Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity. In: *Bioinorganic Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1988. pp. 27-102.
60. Sánchez Delgado GY, Paschoal D, de Oliveira MAL, Dos Santos HF. Structure and redox stability of [Au(III)(X^N^X)PR3] complexes (X = C or N) in aqueous solution: The role of phosphine auxiliary ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2019,**200**:110804.
61. Marzano C, Gandin V, Folda A, Scutari G, Bindoli A, Rigobello MP. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2007,**42**:872-881.
62. Bielski ER, Zhong Q, Brown M, da Rocha SR. Effect of the Conjugation Density of Triphenylphosphonium Cation on the Mitochondrial Targeting of Poly(amidoamine) Dendrimers. *Mol Pharm* 2015,**12**:3043-3053.
63. Abu-Gosh SE, Kolvazon N, Tirosh B, Ringel I, Yavin E. Multiple triphenylphosphonium cations shuttle a hydrophilic peptide into mitochondria. *Mol Pharm* 2009,**6**:1138-1144.

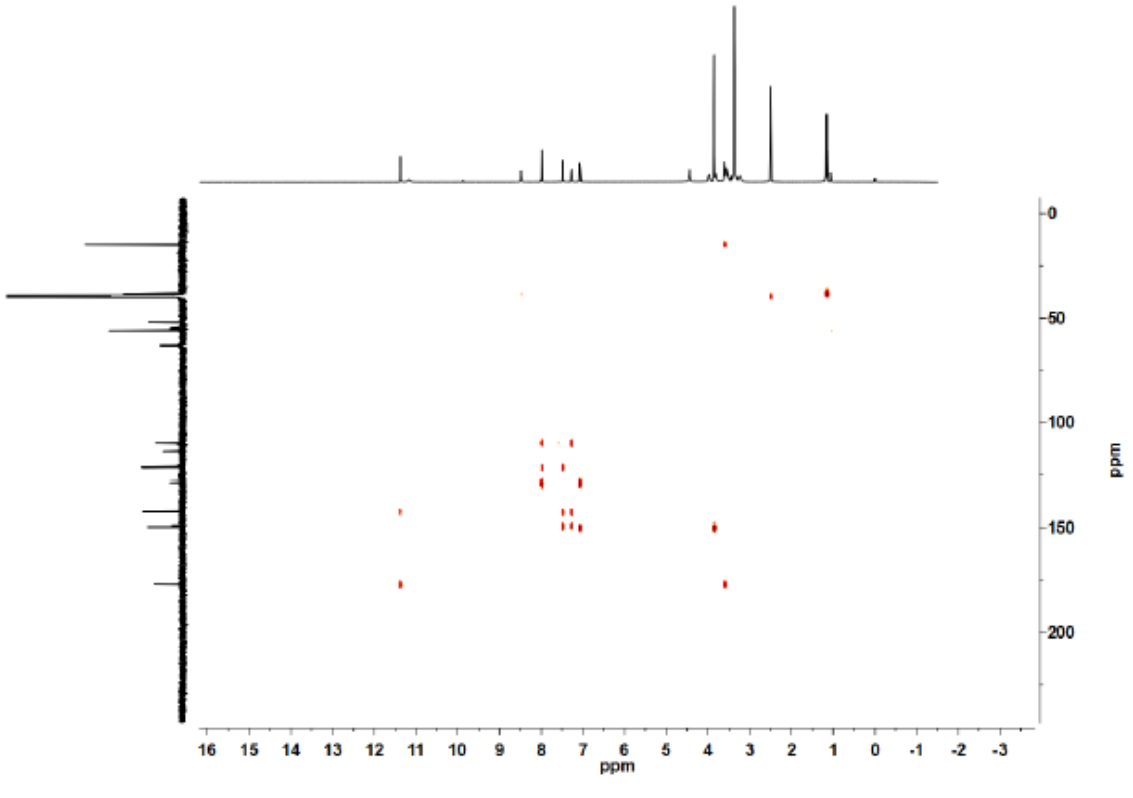
64. Modica-Napolitano JS, Aprille JR. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2001,**49**:63-70.
65. Murphy MP, Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007,**47**:629-656.
66. Yang CT, Kim YS, Wang JJ, Wang LJ, Shi JY, Li ZB*, et al.* Cu-64-Labeled 2-(Diphenylphosphoryl)ethyldiphenylphosphonium Cations as Highly Selective Tumor Imaging Agents: Effects of Linkers and Chelates on Radiotracer Biodistribution Characteristics. *Bioconjugate Chemistry* 2008,**19**:2008-2022.
67. Dammak K, Porchia M, De Franco M, Zancato M, Naili H, Gandin V*, et al.* Antiproliferative Homoleptic and Heteroleptic Phosphino Silver(I) Complexes: Effect of Ligand Combination on Their Biological Mechanism of Action. *Molecules* 2020,**25**.
68. Silva DES, Becceneri AB, Santiago JVB, Gomes Neto JA, Ellena J, Cominetti MR*, et al.* Silver(I) complexes of 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones and triphenylphosphine: structural, cytotoxicity, and apoptotic studies. *Dalton Trans* 2020,**49**:16474-16487.
69. Liu N, Tian H, Zhang G, Sun N, Wang S. Effect of combined treatment with lobaplatin and osthole on inducing apoptosis and inhibiting proliferation in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Med Oncol* 2021,**39**:16.
70. Beebe SJ, Celestine MJ, Bullock JL, Sandhaus S, Arca JF, Cropek DM*, et al.* Synthesis, characterization, DNA binding, topoisomerase inhibition, and apoptosis induction studies of a novel cobalt(III) complex with a thiosemicarbazone ligand. *J Inorg Biochem* 2020,**203**:110907.
71. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995,**18**:62-63.
72. Papathanasiou P, Salem G, Waring P, Willis AC. Synthesis of gold(I), silver(I) and copper(I) complexes containing substituted (2-aminophenyl)phosphines. Molecular structures of [AuI(2-H2NC6H4PPh2)], [AuI{(+/-)-2-H2NC6H4PMePh}] and (+/-)[Cu(2-H2NC6H4PPh2)(2)]PF6. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* 1997:3435-3443.
73. Nga NTH, Ngoc TTB, Trinh NTM, Thuoc TL, Thao DTP. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Anal Biochem* 2020,**610**:113937.
74. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 2013,**124**:1-19.
75. Hu Q, Xu S. Sequence and chiral selectivity of drug-DNA interactions revealed by force spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014,**53**:14135-14138.
76. Misiak M, Mantegazza F, Beretta GL. Methods for Elucidation of DNA-Anticancer Drug Interactions and their Applications in the Development of New Drugs. *Curr Pharm Des* 2016,**22**:6596-6611.
77. Kypr J, Kejnovska I, Renciuk D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res* 2009,**37**:1713-1725.
78. Liu J, Zhang T, Lu T, Qu L, Zhou H, Zhang Q*, et al.* DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. *J Inorg Biochem* 2002,**91**:269-276.
79. Miles AJ, Wallace BA. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chemical Society Reviews* 2016,**45**:4859-4872.
80. Kellett A, Molphy Z, Slator C, McKee V, Farrell NP. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. *Chem Soc Rev* 2019,**48**:971-988.
81. Husain MA, Yaseen Z, Rehman SU, Sarwar T, Tabish M. Naproxen intercalates with DNA and causes photocleavage through ROS generation. *Febs Journal* 2013,**280**:6569-6580.
82. Rehman SU, Sarwar T, Husain MA, Ishqi HM, Tabish M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. *Arch Biochem Biophys* 2015,**576**:49-60.
83. Guan Y, Shi R, Li X, Zhao M, Li Y. Multiple binding modes for dicationic Hoechst 33258 to DNA. *J Phys Chem B* 2007,**111**:7336-7344.
84. Bucevicius J, Lukinavicius G, Gerasimaite R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* 2018,**6**.

7. ANEXOS

Anexo 1: Espectro do experimento HSQC para o ligante VMTSC.



Anexo 2: Espectro do experimento HMBC para o ligante VMTSC



Anexo 3: Dados cristalográficos e de refinamento da estrutura do complexo.

Compound	**M1**
Formula	$C_{53}H_{57}AgCl_2N_4O_3P_2S$
$D_{calc.}$/ g cm^{-3}	1.375
μ/mm^{-1}	0.641
Formula Weight	1070.79
Colour	clear light colourless
Shape	block
Size/mm^3	0.16×0.15×0.10
T/K	293(2)
Crystal System	triclinic
Space Group	P-1
a/Å	10.1979(10)
b/Å	14.9965(15)
c/Å	18.2917(18)
α/°	94.174(8)
β/°	105.819(9)
γ/°	103.753(9)
V/Å^3	2585.8(5)
Z	2
Z'	1
Wavelength/Å	0.71073
Radiation type	Mo K_α
Θ_{min}/°	2.550
Θ_{max}/°	26.500
Measured Refl.	14993
Independent Refl.	10710
Reflections with I > 2(I)	6316
R_{int}	0.0470
Parameters	597
Restraints	0
Largest Peak	0.561
Deepest Hole	-0.661
GooF	1.028
wR_2 (all data)	0.1728
wR_2	0.1322
R_1 (all data)	0.1131
R_1	0.0558