

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FÍSICO-QUÍMICA
E INORGÂNICA**

Débora Eduarda Soares Silva

**Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes
tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer
de mama triplo negativo**

Araraquara
2020

Débora Eduarda Soares Silva

**Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes
tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer
de mama triplo negativo**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d Silva, Débora Eduarda Soares
Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo
ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra
células de câncer de mama triplo negativo / Débora Eduarda
Soares Silva. – Araraquara : [s.n.], 2020
166 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Química
Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto
Coorientador: Fernando Rogério Pavan

1. Compostos de prata. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Mamas -
Câncer. 4. Quimioterapia. 5. Apoptose. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: “Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer de mama triplo negativo”

AUTORA: DÉBORA EDUARDA SOARES SILVA

ORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO

COORDENADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

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



Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a ANA MARIA DA COSTA FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Química Fundamental / Instituto de Química - USP - São Paulo



Prof.^a Dr.^a CLAUDIA BINCOLETTI TRINDADE (Participação Virtual)
Departamento de Farmacologia / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo



Prof.^a Dr.^a MÁRCIA REGINA COMINETTI (Participação Virtual)
Departamento de Gerontologia / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCar - São Carlos



Prof. Dr. VICTOR MARCELO DEFLON (Participação Virtual)
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 06 de novembro de 2020

DADOS CURRICULARES**DADOS PESSOAIS**

Nome: Débora Eduarda Soares Silva
Data de Nascimento: 23/04/1993 **E-mail:** deboraeduarda.soares@gmail.com
Nacionalidade: Brasileira **Endereço:** Av. Sebastião Apº Lopes, 177.
Naturalidade: São Gotardo – MG Vila Santana. Araraquara – SP.
Filiação: Maria de Lourdes da Silva
Antonio Soares da Silva

FORMAÇÃO ACADÊMICA**2016 – 2020 Doutorado em Química**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IQ – UNESP, Campus de Araraquara. Programa de Pós-Graduação em Química.

Projeto: “Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer de mama triplo negativo”.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto.

2014 – 2016 Mestrado em Química

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.

Projeto: “Complexos de metais de transição multifuncionais para o tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer”.

Orientador: Profª. Drª. Rose Maria Carlos.

2010 – 2014 Bacharelado em Química

Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba.

ATIVIDADES ACADÊMICA RELEVANTES**Estágio de docência**

2017 Química Inorgânica Descritiva.

Docente responsável: Prof. Dr. Adelino Vieira Godoy Netto.

Avaliação de trabalhos

2017 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

Orientações

2019 – 2020 Júlia Leão Sakaguchi Martins

Iniciação científica “ Síntese, caracterização e estudos biológicos de novos complexos
(co-orientador) de prata (I) com ligantes tiossemicarbazonas e fosfinas”.

Prêmios e Títulos

2018 Best Poster: Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry / VI Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry / Brazilian Meeting on Rare Earths, SBQ – Divisão de Química Inorgânica

2013 Menção Honrosa: Simpósio de Integração Acadêmica SIA UFV. Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba.

Artigos científicos publicados em periódicos

1. Thales Reggiani de Moura, Renan Diego Zanetti, **Débora Eduarda Soares Silva**, Renan Lira de Farias, Antonio Eduardo Mauro, José Clayston Melo Pereira, Aline Aparecida de Souza, Fábio da Silva Siqueira, Wagner Alves de Souza Júdice, Mauro Almeida Lima, Fillipe Vieira Rocha, Victor Marcelo Deflon and Adelino Vieira de Godoy Netto. Palladium(II) complexes bearing 1-iminothiolate-3,5-dimethylpyrazoles: synthesis, cytotoxicity, DNA binding and enzymatic inhibition studies. **New J. Chem.**, 2020.
2. **SILVA, D. E. S.**; BECCENERI, A. B.; SANTIAGO, J. V. B.; NETO, J. A. G.; ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; PEREIRA, J. C. M.; HANNON, M.; NETTO, A. V. G. Silver(I) complexes of 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones and triphenylphosphine: structural, cytotoxic and apoptotic studies. **Dalton Trans**, 2020.

3. DE CAMARGO, B. A. F.; **SILVA, D. E. S.**; DA SILVA, A. N.; CAMPOS, D. L.; RIBEIRO, T. R. M.; MIELI, M. J.; ZANATTA, M. B. T.; DA SILVA, P. B.; PAVAN, F. R.; MOREIRA, C. G.; RESENDE, F. A.; MENEGÁRIO, A. A.; CHORILLI, M.; NETTO, A. V. G.; BAUAB, T. M. A new silver (I) coordination compound loaded into polymeric nanoparticles as a strategy to improve in vitro anti-Helicobacter pylori activity. **Molecular Pharmaceutics**, 17, 7, 2287–2298, 2020.
4. **SILVA, D. E. S.**; BECCENERI, A. B.; SOLCIA, M. C.; SANTIAGO, J. V. B.; MOREIRA, M. B.; GOMES NETO, J. A.; PAVAN, F. R.; COMINETTI, M. R.; PEREIRA, J. C. M.; NETTO, A. V. G. Cytotoxic and apoptotic effects of ternary silver(I) complexes bearing 2-formylpyridine thiosemicarbazones and 1,10-phenanthroline. **Dalton Trans.**, v. 49, p. 5264 – 5275, 2020.
5. DA CUNHA, G. A.; DE SOUZA, R. F.F.; DE FARIAS, R. L.; MOREIRA, M. B.; **SILVA, D. E. S.**; ZANETTI, R. D.; GARCIA, D. M.; SPINDOLA, D. G.; MICHELIN, L. F.G.; BINCOLETTO, C.; DE SOUZA, A. A.; ANTUNES, A. A.; JUDICE, W. A. DE S.; LEITAO, R. C.F.; DEFLON, V. M.; MAURO, A. E.; NETTO, A.V.G. Cyclopalladated compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, p.110944, 2020.
6. ESPURI, P. F.; DOS REIS, L. L.; DE FIGUEIREDO PELOSO, E.; GONTIJO, V. S.; COLOMBO, F. A.; NUNES, J. B.; DE OLIVEIRA, C. E.; DE ALMEIDA, E. T.; **SILVA, D. E. S.**; BORTOLETTO, J.; SEGURA, D. F.; NETTO, A. V. G.; MARQUES, M. J. Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, p. 419 – 432, 2019.
7. **SILVA, D. E. S.**; CALI, M. P.; PAZIN, W. M.; CARLOS-LIMA, E.; SALLES TREVISAN, M. T.; VENÂNCIO, T.; ARCISIO-MIRANDA, M.; ITO, A. S.; CARLOS, R. M. Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A β Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer's Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 9215 – 9227, 2016.
8. BORGES, P. D.; **SILVA, D. E. S.**; CASTRO, N. S.; FERREIRA, C. R.; PINTO, F. G.; TRONTO, J; SCOLFARO, L. Ab initio study of thermoelectric properties of doped SnO₂ superlattices. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 231, p. 123 – 131, 2015.

Artigos submetidos para publicação

1. Farias, R.L., Polez, A.M.R., **Silva, D.E.S.**, Zanetti, R.D., Moreira, M.B., Batista, V.S., Reis, B.L., Nascimento-Júnior, N.M., Rocha, F.V., Lima, M.A., Oliveira, A.B., Ellena, J., Scarim, C.B., Zambom, C.R., Brito, L.D., Garrido, S.S., Melo, A.P.L., Bresolin, L., Tirloni, B., Pereira, J.C.M., Netto, A.V.G. In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two novel complexes based on Ni^{II} bearing k^2N,S -donor ligands. Submetido ao periódico **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Antonio, minha irmã Janaina e sobrinhos Rhyan e Igor, vocês são meu porto seguro. Meu esposo Matheus, por me fazer tão feliz e compartilhar comigo as lutas e vitórias da vida. Nada seria possível sem vocês ao meu lado, amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, pela confiança, incentivo, compreensão e orientação durante esses anos de trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti por abrir as portas do seu laboratório e à Dra. Amanda Blanque Becceneri, por toda ajuda nos ensaios por citometria de fluxo.

À Dra. Paula Aboud Barbugli, pela solicitude e dicas nos ensaios por microscopia de fluorescência confocal.

Ao Prof. Dr. Javier Ellena, pelas medidas de difração de raios X de monocristal.

Ao Prof. Dr. José A. Gomes Neto e João V. B. Santiago, pelas medidas para o ensaio de internalização celular.

Ao Nivaldo, pelos experimentos de RMN e dicas para o trabalho.

Ao Rafael, pela amizade e paciência com meu jeito mandona. Por toda a ajuda no laboratório, especialmente no laboratório de células. Juntos conseguimos iniciar as atividades no laboratório de células do Departamento de Química Inorgânica.

Ao Renanzinho, por sempre me ouvir e ser um amigo tão fiel. Também à Naira, por todo o carinho. Os jantares no Ki Restaurante e na Chamosa ficarão para sempre no meu coração.

À minha amiga Gabriela, por me apresentar à sua família e todo carinho em sempre nos receber.

Ao Thales, por toda a ajuda quando cheguei no laboratório e estava perdida. À Nati, pelas palavras de otimismo. Ao Renan Lira, pela parceria, cafés, bolos e boas conversas.

A todos os colegas do grupo Organometálicos, pelas discussões científicas e momentos de descontração.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Antonio, por não medirem esforços em tornarem meus sonhos realidade. Mãe, você é meu exemplo de mulher, não tenho palavras para agradecer por tudo que a senhora fez por mim todos esses anos. Amo vocês!

À minha irmã Janaina, meus sobrinhos Rhyann e Igor, meu cunhado Levi, por todo apoio, incentivo e por nunca deixarem me sentir sozinha. Todas as visitas de vocês em Araraquara estão eternizadas no meu coração. Amo vocês!

Ao meu esposo Matheus, por ser mansidão em meio a tempestade e por me fazer acreditar que tudo é possível. Te amo muito!

A Deus, por iluminar meu caminho, me abençoar com uma família e amigos tão especiais, e me conduzir na luta pelos meus sonhos.

À Capes, pela bolsa de doutorado concedida.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora.”

Eclesiastes 3

Resumo

O câncer de mama é o câncer mais incidente em mulheres em todo o mundo. Entre os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama, o câncer de mama triplo negativo (TNBC) representa aproximadamente 20% de todos os casos. Possui um prognóstico ruim e, atualmente, não existem terapias direcionadas e eficazes para seu tratamento. Desse modo, o desenvolvimento de novos fármacos contra tumores TNBC é urgente. Seis novos complexos de prata (I) contendo ligantes de interesse biológico foram sintetizados, de fórmula geral $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ (**1–3**) e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L5})]$ (**4–6**), onde phen = 1,10-fenantroline; PPh_3 = trifenilfosfina; L1 = 2-formilpiridina tiossemicarbazona; L2 = 2-formilpiridina-N(4)-metil-tiossemicarbazona; L3 = 2-formilpiridina-N(4)-etil-tiossemicarbazona; L4 = 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona; L5 = 3-metoxi-4-[2-(1-morfolinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona; L6 = 3-metoxi-4-[2-(1-piperidinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, condutividade molar, espectrometria de massas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{31}P . Os complexos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L5})]$ e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L6})]$ foram caracterizados por difração de raios X de monocristal. A citotoxicidade *in vitro* dos compostos foi determinada frente as linhagens tumorais A549 (pulmão), MCF-7 (mama - hormônio sensível) e MDA-MB-231 (mama triplo negativo), e linhagem não tumoral MCF-10A (mama). Os complexos foram ativos contra todas as células tumorais testadas, com valores de IC_{50} para 48 horas de incubação na faixa de 1,5 – 20 μM . Particularmente, os compostos apresentaram promissora atividade citotóxica frente a linhagem tumoral MDA-MB-231. Além disso, os compostos foram menos citotóxicos frente as células MCF-10A. Estudos de quantificação celular de prata mostraram que os complexos de prata derivados da trifenilfosfina são internalizados de forma mais eficiente do que os complexos derivados da 1,10 fenantroline nas células MDA-MB-231. Ensaio de morte celular demonstraram que os complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ induzem alterações morfológicas características de apoptose, como encolhimento e arredondamento celular, aumento da porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular e aumento da porcentagem de células apoptóticas marcadas com Anexina V, que evidenciam a morte das células MDA-MB-231 por apoptose. Ambos os compostos também induziram a despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, eventos que podem estar envolvidos na indução de apoptose das células MDA-MB-231. Ensaio de interação com o ctDNA por titulação espectroscópica, dicróismo circular e ensaio de ligação competitiva evidenciaram que os compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ podem interagir com o ctDNA sem modificar a estrutura do DNA (forma B), possivelmente com o sulco menor. A ligação dos complexos de prata com o ctDNA é fraca em comparação com o Hoechst 33258. Nossos resultados sugerem que outros alvos intracelulares ao invés do DNA sejam responsáveis pelos efeitos citotóxicos observados nas células MDA-MB-231, possivelmente as mitocôndrias.

Palavras chaves: complexos de prata, tiossemicarbazonas, câncer de mama, apoptose

Abstract

Breast cancer is the most incident cancer in women worldwide. Considering the different molecular subtypes of breast cancer, triple negative breast cancer (TNBC) comprises about 20% of all cases. It has a poor prognosis and, currently, there are no specific targeted therapies for its treatment. Therefore, the development of new drugs against TNBC tumors is crucial. Six new silver (I) complexes containing ligands of biological importance were synthesized, of general formula $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ (**1–3**) and $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{TSC})]$ (**4–6**), where phen = 1,10-phenanthroline; PPh_3 = triphenylphosphine; L1 = 2-formylpyridine thiosemicarbazone; L2 = 2-formylpyridine-N(4)-methylthiosemicarbazone; L3 = 2-formylpyridine-N(4)-ethylthiosemicarbazone; L4 = 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone; L5 = 3-methoxy-4-[2-(morpholine-1-yl)ethoxy]benzaldehyde thiosemicarbazone; L6 = 3-methoxy-4-[2-(piperidine-1-yl)ethoxy]benzaldehyde thiosemicarbazone. The compounds were characterized by elemental analysis, molar conductance measurements, mass spectrometry, infrared spectroscopy and ^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR. The molecular structures of complexes $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L5})]$ and $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L6})]$ were determined by single crystal X-ray diffraction. The *in vitro* cytotoxicity of compounds were evaluated against the tumor cell lines A549 (lung), MCF-7 (breast-hormone-responsive), MDA-MB-231 (triple negative breast cancer), and non-tumor cell line MCF-10A (breast). The silver compounds were cytotoxic against all tumor cells with IC_{50} values in 48 h of incubation ranging from 1.5 to 20 μM . Particularly, the complexes exhibited appreciable cytotoxic activity against MDA-MB-231 cells. Furthermore, the compounds were less cytotoxic against the non-tumor cells MCF-10A. Cell accumulation studies showed that phosphine compounds were more efficiently internalized than phen compounds in the MDA-MB-231 cells. Cell death studies indicated that compounds $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ and $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ induce morphological changes typical of apoptosis, as cell shrinkage and rounding, an increase of cells at sub-G1 phase of cell cycle and an increase in apoptotic cells stained with Annexin V, evidencing the cell death of MDA-MB-231 cells by apoptosis. Both compounds induced mitochondrial membrane depolarization and increase of reactive oxygen species (ROS) levels, events that may be involved in the induction of apoptosis in the MDA-MB-231 cells. DNA binding studies by spectroscopic titration, circular dichroism and competitive assays with Hoechst 33258 and Thiazole Orange evidenced that compounds $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ and $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ can interact with ctDNA and does so without modifying the B-structure of the DNA, possibly bind to the minor groove. The binding of silver complexes with ctDNA is weak compared to Hoechst 33258. Our findings suggest that other intracellular targets rather than DNA are responsible for the cytotoxic effects observed in the MDA-MB-231 cells, potentially the mitochondria.

Keywords: silver complexes, thiosemicarbazones, breast cancer, apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número estimado de mortes por câncer no mundo em 2018.	24
Figura 2- Compostos baseados em íons metálicos aplicados na terapia ou diagnóstico de doenças. Fonte: Autor.	26
Figura 3 - Complexos de rutênio e gálio com promissora atividade antitumoral. Fonte: Autor.	28
Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo de ação dos íons Ag^+ . Fonte: Adaptado de MIJNENDONCKX <i>et al.</i> , 2013.	29
Figura 5 - Complexos de Ag^{I} com ligantes <i>N</i> -heterocíclicos sintetizados por Ali <i>et al.</i> Fonte: Autor.	30
Figura 6 - Complexos Ag^{I} -NHC sintetizados por Young (A) e Allison (B). Fonte: Autor.	31
Figura 7- Complexo de Ag^{I} com fosfinas sintetizado por Engelbrecht <i>et al.</i> Fonte: Autor. ..	32
Figura 8 - Tiossemicarbazonas α - <i>N</i> -heterocíclicas com potencial atividade antitumoral. Fonte: Autor.	34
Figura 9 - Complexos de cobre derivados de tiossemicarbazonas sintetizados por Gu <i>et al.</i> Fonte: Autor.	35
Figura 10 - Complexos de Ag^{I} derivados de tiossemicarbazonas sintetizados por Halim <i>et al.</i> Fonte: Autor.	36
Figura 11 - Complexos de Ag^{I} derivados da phen sintetizados por Thornton <i>et al.</i> Fonte: Autor.	37
Figura 12 - Complexos de Ag^{I} contendo fosfinas sintetizados por Banti <i>et al.</i> Fonte: Autor.	39
Figura 13 - Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas. Fonte: Autor.	58
Figura 14 - Estrutura dos ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas. Fonte: Autor.	59
Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H dos compostos vanilina, VM e VP em solução de $\text{DMSO}-d_6$. Fonte: Autor.	60
Figura 16 - Representação da numeração adotada para atribuição dos hidrogênios constituintes dos compostos vanilina, VM e VP. Fonte: Autor.	61
Figura 17 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes derivados da vanilina em KBr.	62
Figura 18 - Representação da numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes das tiossemicarbazonas derivadas da vanilina. Fonte: Autor.	63

Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H dos ligantes L5 e L6 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor.....	64
Figura 20 - Espectros de DEPTQ dos ligantes L5 e L6 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor.	65
Figura 21 - Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas. Fonte: Autor.	66
Figura 22 - Possíveis modos de coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas. Fonte: Autor.	67
Figura 23 - Clusters de prata (I) com tiossemicarbazonas sintetizados por (A) Onodera, (B) Castiñeiras, (C) Ashfield e (D) Li. Fonte: Adaptado de ASHFIELD, 2004; ONODERA, 2007b; CASTINEIRAS, 2009; LI, 2010.	68
Figura 24 - Complexos de prata (I) com tiossemicarbazonas e trifenilfosfina sintetizados por Lobana <i>et al.</i> Fonte: Autor.....	68
Figura 25 - Equilíbrio tautomérico tiossemicarbazonas. Fonte: Autor.	70
Figura 26 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos 1–3 em KBr. Fonte: Autor.....	71
Figura 27 - Representação da numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes dos compostos 4–6 . Fonte: Autor.....	73
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 1 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor.	74
Figura 29 - Espectro de DEPTQ do complexo 1 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor. ...	76
Figura 30 - Espectros de ESI-MS dos compostos 1–3 em solução de metanol. Fonte: Autor.	78
Figura 31 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos 4–6 em KBr. Fonte: Autor.....	80
Figura 32 - Projeção ORTEP dos complexos 5 e 6 mostrando a numeração dos átomos ao redor do centro metálico Ag^{I} e elipsoides em nível de probabilidade de 50%. Fonte: Autor.....	82
Figura 33 - Representação da numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes dos compostos 4–6 . Fonte: Autor.	84
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 4 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor.	85
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 5 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor.	86
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 6 em solução de DMSO- d_6 . Fonte: Autor.	86

- Figura 37** - Espectro de DEPTQ do complexo **4** em solução de DMSO-d₆. **Fonte:** Autor. ...88
- Figura 38** - Espectro de DEPTQ do complexo **5** em solução de DMSO-d₆. **Fonte:** Autor. ...89
- Figura 39** - Espectro de DEPTQ do complexo **6** em solução de DMSO-d₆. **Fonte:** Autor. ...89
- Figura 40** - Espectro de RMN de ³¹P dos compostos **4–6** em solução de DMSO-d₆. **Fonte:** Autor.91
- Figura 41** - Teste de estabilidade dos complexos **1–3** em DMSO-d₆. Espectros de RMN de ¹H do complexo **1** em solução de DMSO-d₆ registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.92
- Figura 42** - Teste de estabilidade do complexo **1** em tampão Tris-HCl. Espectros de UV-Vis do complexo **1** em tampão Tris-HCl (pH 7,4; 2% DMSO) registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.93
- Figura 43** - Teste de estabilidade do complexo **1** em DMEM. Imagens de soluções do complexo **1** (1 mg mL⁻¹, 5% DMSO) em DMEM registradas por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.94
- Figura 44** - Teste de estabilidade dos complexos **4–6** em DMSO-d₆/D₂O. Espectros de RMN de ¹H dos complexos (A) **4**, (B) **5** and (C) **6** em solução de DMSO-d₆/D₂O (80:20% v/v) registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.95
- Figura 45** - Teste de estabilidade dos complexos **4–6** em tampão Tris-HCl. Espectros de UV-Vis dos compostos (A) **4**, (B) **5** and (C) **6** em tampão Tris-HCl (pH 7,4; 2% DMSO) registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.96
- Figura 46** – Gráficos de viabilidade celular das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231, A549 e MCF-10A, após 48 horas de incubação com os complexos de prata **1–6**. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicata. **Fonte:** Autor.97
- Figura 47** - Internalização de prata nas células tumorais MDA-MB-231. As células foram tratadas com os compostos [Ag(phen)(L1-L3)](NO₃) e [AgCl(PPh₃)₂](TSC) por 6 e 3 horas, respectivamente. A absorção celular de Ag foi quantificada por HR-CS GFAAS. **Fonte:** Autor.100
- Figura 48** - Representação dos tipos de interação com o DNA. **Fonte:** Adaptado de BARRA; NETTO, 2015.102
- Figura 49** - Espectros de UV-Vis dos compostos **1** (A) e **4** (B) em tampão tris-HCl (pH 7,4) na presença de quantidades crescentes de ctDNA. [complexo] = 20 μM; [ctDNA] = 0 – 60 μM. Gráfico inserido: 1/[DNA] vs. A₀/(A-A₀). **Fonte:** Autor.103
- Figura 50** - Espectros de CD do ctDNA livre e na presença dos compostos **1** (A) e **4** (B) em tampão tris-HCl (pH 7,4). [ctDNA] = 50 μM. r = [complexo] / [DNA]. **Fonte:** Autor.105
- Figura 51** – **A)** Estrutura do Hoechst 33258; **B)** Espectro de emissão do Hoechst livre e do aduto Hoechst-ctDNA em tampão Tris-HCl; **C)** Representação da ligação do Hoechst 33258 ao

sulco menor do B-DNA. **Fonte:** Adaptado de BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITIS, 2018. 106

Figura 52 - Espectro de emissão do complexo Hoechst-ctDNA ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$) na presença dos compostos **1** (A) e **4** (B) ($6 - 60 \mu\text{M}$) em tampão tris-HCl (pH 7,4). [DNA] = $60 \mu\text{M}$; [TO] = $6 \mu\text{M}$. Gráfico inserido: [complexo] vs porcentagem de emissão do complexo Hoechst-ctDNA. 107

Figura 53 – A) Estrutura do Tiazol Orange (TO); B) Espectro de emissão do TO livre em solução e do aduto TO-ctDNA em tampão Tris-HCl. **Fonte:** Autor. 108

Figura 54 - Espectro de emissão do complexo TO-ctDNA ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) na presença do composto **1** ($6 - 60 \mu\text{M}$) em tampão tris-HCl (pH 7,4). [DNA] = $60 \mu\text{M}$; [TO] = $6 \mu\text{M}$. Gráfico inserido: [complexo] vs porcentagem de emissão do complexo TO-ctDNA. 108

Figura 55 - Efeitos citotóxicos do complexo **1**. Morfologia celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A analisada após 48h de tratamento com diferentes concentrações de **1**. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor. 109

Figura 56 - Efeitos citotóxicos do complexo **4**. Morfologia celular das células MDA-MB-231 analisada após 24h e 48h de tratamento com diferentes concentrações de **4**. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor. 110

Figura 57 - Análise do ciclo celular das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **1**. A) Gráfico representativo da porcentagem de células em diferentes frações (Sub G1, G1, S e G2/M) após o tratamento com $10 \mu\text{M}$ de **1** e $40 \mu\text{M}$ de camptotecina por 48 horas. B) Histogramas representativos do ciclo celular com marcação com iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A). O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor. 112

Figura 58 - Análise do ciclo celular das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **4**. A) Gráfico representativo da porcentagem de células em diferentes frações (Sub G1, G1, S e G2/M) após o tratamento com $6 \mu\text{M}$ de **4** e $20 \mu\text{M}$ de camptotecina por 48 horas. B) Histogramas representativos do ciclo celular com marcação com iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A). O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor. 113

Figura 59 - Esquema representativo do corante JC-1 na mitocôndria. Em células viáveis com $\Delta\Psi_{\text{m}}$ normal, ocorre a formação dos agregados de JC-1. Após a despolarização de $\Delta\Psi_{\text{m}}$, JC-1 permanece na forma de monômeros. **Fonte:** Adaptado de SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019. 115

Figura 60 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{m}}$) das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **1** por 4 horas, marcação com JC-1. As células com membranas mitocondriais intactas são representadas em vermelho, enquanto as células com perda de $\Delta\Psi_{\text{m}}$ são mostradas em verde A) *Dot plots* representativos das células após o tratamento com 10 , 20 e $40 \mu\text{M}$ de **1** e $50 \mu\text{M}$ de cisplatina. B) Gráficos representativos da

porcentagem de células com fluorescência verde. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor. 116

Figura 61 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **4** por 4 horas, marcação com JC-1. As células com membranas mitocondriais intactas são representadas em vermelho, enquanto as células com perda de $\Delta\Psi_m$ são mostradas em verde **A)** *Dot plots* representativos das células após o tratamento com 6, 12 e 24 μM de **4** e 50 μM de cisplatina. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células com fluorescência verde. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor. 117

Figura 62 - Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **1** (5, 10 e 20 μM) e 50 μM de cisplatina por 24 e 48 horas, marcação com H₂DCFDA. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor. 119

Figura 63 - Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **4** (6 e 12 μM) e 50 μM de cisplatina por 24 horas, marcação com H₂DCFDA. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor. 119

Figura 64 - Análise de morte celular induzida nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **1** (5, 10 e 20 μM) e 20 μM de camptotecina por 48 horas, marcação com Hoechst 33342/PI. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor. 121

Figura 65 - Análise de morte celular induzida nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **4** (6 e 12 μM) e 20 μM de camptotecina por 24 horas, marcação com Hoechst 33342/PI. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor. 121

Figura 66 - Detecção de apoptose nas células MDA-MB-231 com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A). **A)** *Dot plots* representativos das células após o tratamento com diferentes concentrações de **1** e 40 μM de camptotecina por 48 horas. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células em apoptose. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor. 123

Figura 67 - Detecção de apoptose nas células MFC-10A com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A). **A)** *Dot plots* representativos das células após o tratamento com diferentes concentrações de **1** e 40 μM de camptotecina por 48 horas. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células em apoptose. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$ e **** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor. 124

Figura 68 - Detecção de apoptose nas células MDA-MB-231 com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A). **A)** *Dot plots* representativos das células após o tratamento com 6 e 12 μM de **4** e 20 μM de camptotecina por 48 horas. **B)** Gráficos

representativos da porcentagem de células em apoptose. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$). **Fonte:** Autor. 125

Figura 69 – Possível mecanismo de ação dos compostos de prata nas células MDA-MB-231. **Fonte:** Autor. 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos espectros de RMN de ^1H dos compostos vanilina, **VM** e **VP** em DMSO- d_6 . Deslocamento químico (ppm), multiplicidade, integral (nH) e constante de acoplamento (J, Hz). 61

Tabela 2 - Rendimento, massa molar (g mol^{-1}) e dados de análise elementar (CHN) dos compostos **L5** e **L6**. 62

Tabela 3 - Rendimento, massa molar (g mol^{-1}), condutividade molar ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$), e dados de análise elementar (CHN) dos complexos **1–3**. 70

Tabela 4 - Atribuição das principais frequências vibracionais presentes nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e complexos **1–3**. 72

Tabela 5 - Dados dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **1–3** e ligantes livres (1,10-fenantrolina, L1-L3) em DMSO- d_6 . Deslocamento químico (ppm), multiplicidade, integral (nH) e constante de acoplamento (J, Hz). 75

Tabela 6 - Atribuição dos principais sinais de ^{13}C dos ligantes tiossemicarbazonas e complexos **1–3**. 77

Tabela 7 - Rendimento, massa molar e dados de análise elementar (CHN) dos complexos **4–6**. 80

Tabela 8 - Atribuição das principais frequências vibracionais presentes nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e complexos **4–6**. 81

Tabela 9 - Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$) dos complexos **5** e **6**. 83

Tabela 10 - Dados dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **4–6** e tiossemicarbazonas em DMSO- d_6 . Deslocamento químico (ppm), multiplicidade, integral (nH) e constante de acoplamento (J, Hz). 87

Tabela 11 - Atribuição dos principais sinais de ^{13}C dos ligantes tiossemicarbazonas e complexos **4–6**. (δ (ppm), DMSO- d_6). 90

Tabela 12 - Atividade citotóxica dos complexos de prata (I) e ligantes tiossemicarbazonas. IC_{50} (μM) dos compostos nas células A549, MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A após 48 h de incubação. ^aIS = Índice de seletividade: $\text{IC}_{50} \text{ MCF-10A} / \text{IC}_{50} \text{ MDA-MB-231}$. **Fonte:** Autor. 98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Planejamento dos complexos de prata (I): i) compostos derivados da 1,10-fenantrolina e 2-formilpiridina tiossemicarbazonas; ii) complexos derivados da trifenilfosfina e vanilina tiossemicarbazonas. Fonte: Autor.....	41
Esquema 2 - Síntese dos ligantes derivados do 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído. Fonte: Autor.	59
Esquema 3 - Síntese dos complexos derivados da 1,10-fenantrolina. Fonte: Autor.	69
Esquema 4 - Síntese dos complexos derivados da trifenilfosfina. Fonte: Autor.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

A549	Carcinoma pulmonar
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Dicroísmo Circular (<i>Circular Dichroism</i>)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
ctDNA	Ácido desoxirribonucleico de timo de bezerro (<i>Calf thymus</i>)
DEPTQ	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Including the Detection of Quaternary Nuclei</i>
DMEM	Meio Dulbecco Modificado (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EP	Receptor de Progesterona (<i>Progesteron Receptor</i>)
ER	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fosfatidilserina
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano (<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina
MCF-7	Adenocarcinoma de mama – hormônio sensível
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama triplo negativo
MCF-10A	Linhagem não-tumoral humana de mama
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Iodeto de propídio
PBS	Tampão salino de fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
TNBC	Câncer de mama triplo negativo (<i>Triple Negative Breast Cancer</i>)
TO	Tiazol Orange
TrxR	Tiorredoxina redutase
TSC	Tiossemicarbazona
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Estatísticas do câncer	23
1.2	O câncer de mama.....	24
1.3	Complexos metálicos no tratamento do câncer	25
1.4	Compostos de prata (I).....	28
1.5	Planejamento de complexos de prata (I).....	32
1.5.1	<i>Tiossemicarbazonas</i>	33
1.5.2	<i>1,10-Fenantrolina</i>	36
1.5.3	<i>Fosfinas</i>	38
1.6	Hipótese do trabalho	39
2	OBJETIVOS.....	42
3	PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1	Reagentes	43
3.2	Instrumentação	43
3.3	Difração de raios X de monocristal	43
3.4	Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas	44
3.4.1	<i>2-formilpiridina tiossemicarbazonas</i>	44
3.4.2	<i>Vanilina tiossemicarbazonas</i>	45
3.5	Síntese dos complexos de prata (I)	47
3.5.1	<i>Complexos do tipo [Ag(phen)(L1-L3)](NO₃)</i>	47
3.5.2	<i>Complexos do tipo [AgCl(PPh₃)₂(L4-L6)]</i>	48
3.6	Ensaio de estabilidade em solução	50
3.7	Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	50
3.7.1	<i>Diluição dos compostos</i>	51
3.7.2	<i>Linhagens celulares</i>	51
3.7.3	<i>Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT</i>	51
3.7.4	<i>Quantificação celular de prata por GFAAS</i>	52
3.7.5	<i>Análise da morfologia celular</i>	53
3.7.6	<i>Análise do ciclo celular</i>	53
3.7.7	<i>Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	53
3.7.8	<i>Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular</i>	54
3.7.9	<i>Ensaio de marcação com Hoechst 33342/iodeto de propídio</i>	54

3.7.10	<i>Ensaio de apoptose com Anexina V</i>	54
3.7.11	<i>Análise estatística</i>	55
3.8	Ensaio de interação com o ctDNA	55
3.8.1	<i>Titulação espectroscópica</i>	56
3.8.2	<i>Dicroísmo circular</i>	56
3.8.3	<i>Ensaio de competição com Hoechst 33258 e Tiazol Orange (TO)</i>	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas	58
4.2	Síntese dos complexos de prata (I)	66
4.2.1	<i>Considerações iniciais sobre complexos de prata (I) e tiossemicarbazonas</i>	66
4.2.2	<i>Síntese e caracterização dos complexos do tipo [Ag(phen)(L1-L3)](NO₃)</i>	69
4.2.3	<i>Síntese dos complexos do tipo [AgCl(PPh₃)₂(L4-L6)]</i>	79
4.3	Ensaio de estabilidade em solução	91
4.4	Ensaio biológico	97
4.4.1	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	97
4.4.2	<i>Quantificação celular de prata por GFAAS</i>	99
4.4.3	<i>Ensaio de interação com o ctDNA</i>	101
4.4.4	<i>Análise da morfologia celular</i>	109
4.4.5	<i>Análise do ciclo celular</i>	111
4.4.6	<i>Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	114
4.4.7	<i>Análise da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)</i>	118
4.4.8	<i>Deteção de Apoptose</i>	120
4.5	Considerações sobre os ensaios biológicos	126
5	CONCLUSÕES	131
6	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICE	145
	ANEXOS	165

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estatísticas do câncer

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sua incidência e mortalidade crescem rapidamente (OMS). As razões para esse rápido crescimento são complexas, mas refletem o envelhecimento e crescimento da população, bem como o desenvolvimento socioeconômico (BRAY *et al.*, 2018). No ano de 2018, estudos do projeto GLOBOCAN/IARC (International Agency for Research on Cancer) estimaram mais de 18 milhões de casos novos e 9,5 milhões de mortes por câncer no mundo (FERLAY *et al.*, 2019). O câncer de pulmão é o mais frequente entre os homens, seguido pelo câncer de próstata. Em 2018, ocorreram 1,3 milhões de casos novos e 360 mil mortes por câncer de próstata. Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais incidente, com 2,1 milhões de casos novos. É também a principal causa de morte por câncer em mulheres (626 mil mortes). No Brasil, quase 600 mil novos casos de câncer por ano foram estimados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o biênio 2018-2019. Entre eles, 68 mil casos de câncer de próstata e 59 mil casos de câncer de mama. Além de aproximadamente 31 mil casos de câncer de pulmão em toda a população brasileira (INCA).

O termo câncer é utilizado para descrever um conjunto de mais de 100 tipos de doenças, as quais são caracterizadas pela proliferação desordenada de células anormais. O câncer surge a partir de uma mutação genética, e sua origem se dá por condições multifatoriais (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Fatores de risco são particularmente relacionados aos hábitos de vida e dieta, tais como consumo de tabaco e álcool, obesidade e sedentarismo. Particularmente, o uso do tabaco é responsável por aproximadamente 22% do total de números de mortes por câncer no mundo (OMS). Além disso, infecções crônicas são fatores de risco importantes para países de baixa e média renda. Em 2012, 13% do total de novos casos de câncer foram atribuídos a infecções carcinogênicas, como *Helicobacter pylori*, Papilomavírus Humano (HPV) e vírus da Hepatite B e C (DE MARTEL *et al.*, 2020). As principais causas de morte por câncer no ano de 2018 são apresentadas na Figura 1.

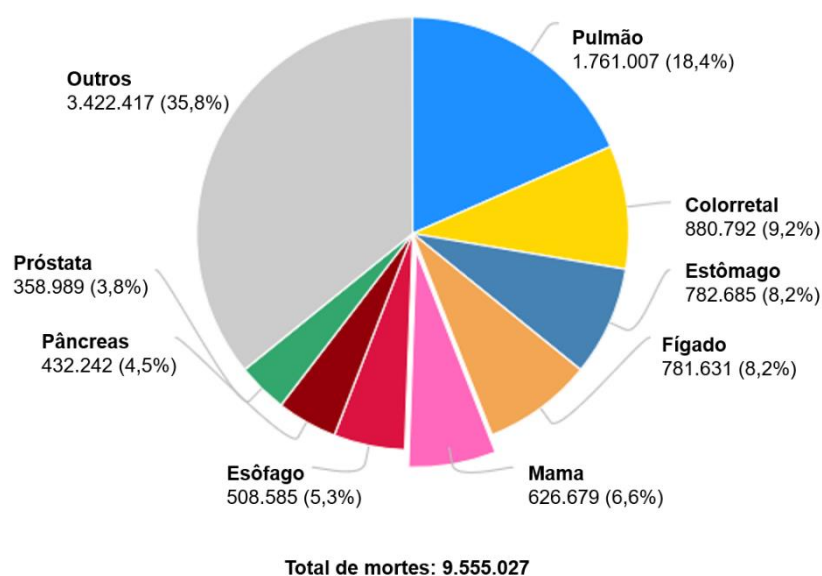


Figura 1- Número estimado de mortes por câncer no mundo em 2018.

Fonte: Adaptado de <http://gco.iarc.fr/>

1.2 O câncer de mama

O câncer de mama (CM) é um grave problema de saúde pública que afeta a vida de milhões de mulheres. Diferentes fatores de riscos estão associados ao câncer de mama, tais como envelhecimento, menopausa tardia, idade média da primeira gravidez, histórico familiar, obesidade após a menopausa, entre outros. O diagnóstico precoce, em estágios iniciais da doença, é a principal estratégia para melhorar os resultados do tratamento (INCA). O tratamento do CM pode ser dividido em duas modalidades, tratamento local (cirurgia e radioterapia) e sistêmico (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica) (INCA). Os tumores de mama se diferem quanto ao comportamento, evolução e resposta ao tratamento. Logo, a escolha do tratamento depende do estágio em que a doença se encontra (estadiamento) e da natureza do tumor (INCA).

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, com subtipos distintos. Os subtipos moleculares do câncer de mama são identificados a partir de uma avaliação imunoistoquímica com base na expressão de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (EP), e receptores do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (TAO *et al.*, 2015). O subtipo de câncer de mama triplo negativo, conhecido por TNBC (*triple negative breast cancer*), é

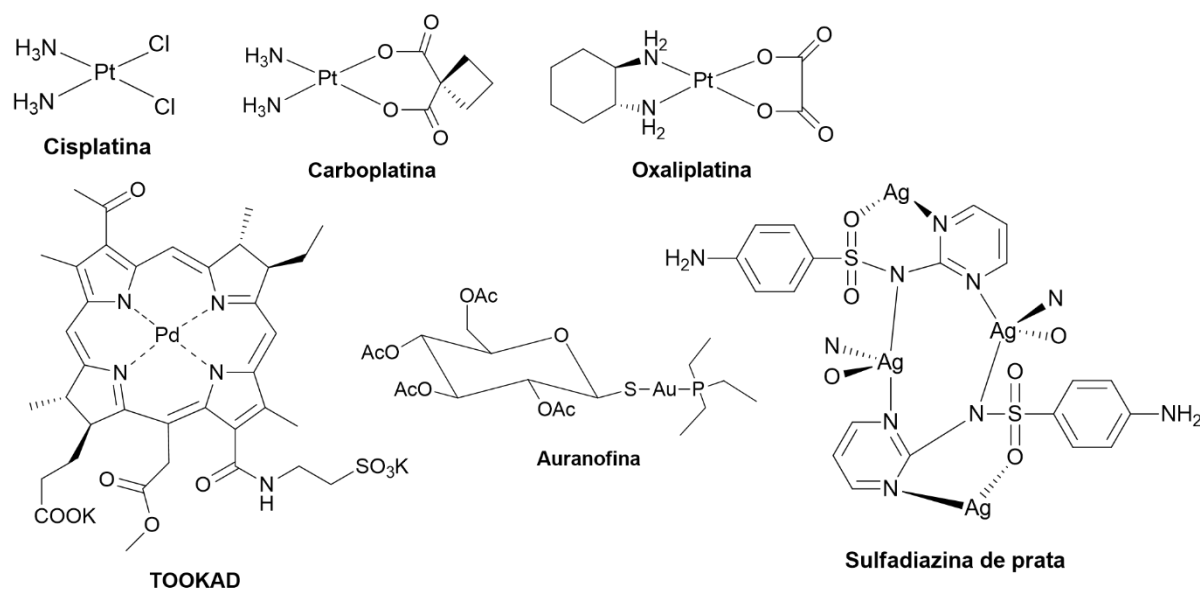
caracterizado pela ausência dos receptores de progesterona (EP) e estrogênio (ER), e por não apresentar amplificação do HER2.

Os tumores TNBC representam aproximadamente 15 – 20% de todos os casos de CM, e possuem como característica comum natureza altamente agressiva. O câncer de mama triplo negativo possui o pior prognóstico comparado aos outros subtipos, principalmente devido ao elevado potencial metastático e opções limitadas de tratamento. O tratamento de pacientes com tumores subtipo ER+ e/ou HER2+ pode ser realizado com o uso de terapias direcionadas, como Tamoxifeno e Trastuzumab, respectivamente. Entretanto, ainda não existem terapias direcionadas para o tratamento de tumores TNBC, sendo a quimioterapia o tratamento padrão utilizado. Quimioterápicos incluindo antraciclinas, taxanos e metalo-fármacos de platina são comumente utilizados (VOJTEK *et al.*, 2019). A sobrevida média para mulheres com TNBC metastático é menor que um ano, e quase todas morrem apesar do tratamento quimioterápico agressivo e tóxico (ABRAMSON *et al.*, 2015). Nesse contexto, é crucial a pesquisa por novos fármacos para o tratamento de tumores TNBC.

1.3 Complexos metálicos no tratamento do câncer

A importância dos compostos baseados em íons metálicos na medicina é bem representada por uma variedade de metalo-fármacos e/ou radiofármacos já aprovados para uso clínico ou em estudos com resultados promissores. Exemplos de compostos aplicados na terapia ou diagnóstico de diversas doenças são apresentados na Figura 2. No diagnóstico de doenças, agentes de contraste contendo o radionuclídeo tecnécio-99m são utilizados na tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), assim como íons de gadolínio que são utilizados no contraste por ressonância magnética. Para fins terapêuticos, compostos de ouro são utilizados no tratamento da artrite reumatoide, compostos de prata são empregados no tratamento de feridas e infecções e compostos de platina são utilizados no tratamento do câncer (MJOS, 2014; MEDICI, 2015). Recentemente, o complexo paládio-porfirina TOOKAD-Soluble, que atua como um fotossensibilizador, foi aprovado pela *European Medicines Agency* para o tratamento do câncer de próstata (MCFARLAND *et al.*, 2020). Apesar da sua importância, pequena parte dos fármacos hoje disponíveis no mercado são frutos da Química Inorgânica Medicinal.

Terapia



Diagnóstico

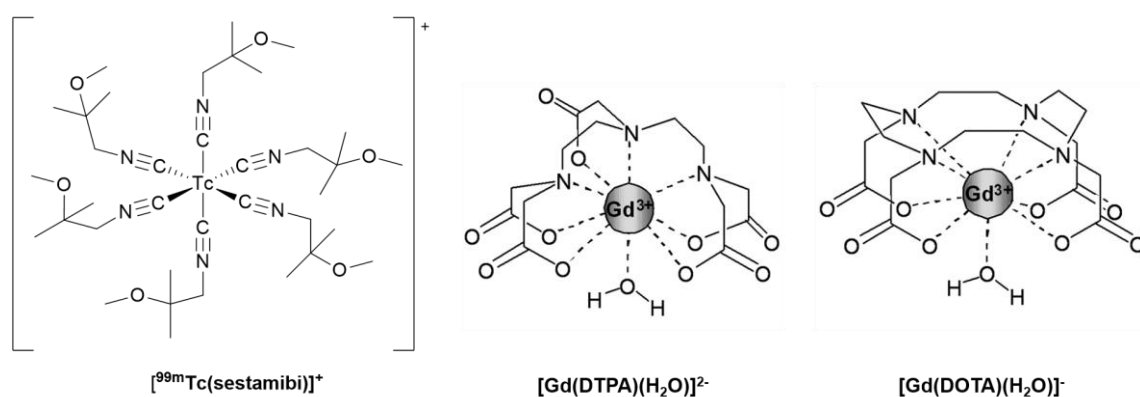


Figura 2- Compostos baseados em íons metálicos aplicados na terapia ou diagnóstico de doenças.
Fonte: Autor.

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina por Rosenberg, em 1965, representa um marco importante para o desenvolvimento da Química Inorgânica Medicinal. A cisplatina é amplamente utilizada no tratamento de vários tumores e o DNA é considerado seu alvo biológico principal. A ligação da cisplatina é irreversível, o íon Pt^{2+} da unidade $\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$ se liga covalentemente ao DNA. Contudo, sabe-se que apenas uma pequena fração da cisplatina se liga ao DNA, e seu modo de ação ainda não foi totalmente elucidado. A cisplatina e análogos, carboplatina e oxaliplatina, são os únicos metalo-fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration dos EUA) para o tratamento do câncer, e são utilizados em aproximadamente 50% do total de regimes quimioterápicos (WHEATE *et al.*, 2010). Entretanto, os metalo-fármacos de platina apresentam alta toxicidade que levam a efeitos

colaterais severos. Além disso, o uso desses compostos é limitado pela resistência adquirida ou intrínseca de células tumorais (SIDDIK, 2003).

Neste contexto, a atividade antitumoral de uma grande variedade de complexos metálicos vem sendo investigada nas últimas décadas, buscando alternativas que superem a toxicidade, resistência e outras desvantagens dos compostos de platina (BRUIJNINCX, 2008; MUHAMMAD, 2014; ZAKI, 2016; SIMPSON, 2019). A pesquisa tem sido dedicada principalmente a compostos que possam exibir mecanismos de ação diferentes daqueles observados para a cisplatina e análogos.

Embora os estudos se concentrem no DNA, o mecanismo de ação de novos potenciais metalo-fármacos tem apontado novos alvos biológicos e a maioria envolve múltiplos alvos (“multitargeted”) (BERGAMO, 2018; KENNY, 2019; ZAKI, 2019). O mecanismo de ação de vários complexos metálicos envolve a interação desses compostos com proteínas responsáveis por diferentes processos celulares tais como tiorredoxina redutase (TrxR), quinases, topoisomerases (Topo), ribonucleotídeo redutase (RR), entre outras. Além disso, com o aumento do conhecimento sobre a carcinogênese em nível molecular, novas estratégias estão sendo utilizadas para o planejamento de novos metalo-fármacos (BARRY, 2013; MUHAMMAD, 2014; NDAGI, 2017).

Complexos de rutênio 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 (ZENG, 2017; LIU, 2019). Dentre o grande número de complexos de rutênio, os compostos NAMI-A e KP1019 (Figura 3) foram os primeiros testados em ensaios clínicos. NAMI-A apresenta eficiente inibição *in vivo* da metástase de tumores, e KP1019 apresenta promissora atividade contra tumores resistentes à cisplatina.

A atividade *in vitro* e *in vivo* de complexos de ouro com ligantes fosfinas, carbenos, ditiocarbamatos e porfirinas também tem sido amplamente investigada. Embora o mecanismo de ação desses compostos não seja completamente conhecido, em geral, os complexos de ouro interagem com o DNA de modo diferente daquele observado para a cisplatina. Além disso, vários estudos mostram que a inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) e indução de apoptose via mitocondrial (mecanismo intrínseco) são características comuns do modo de ação e que podem explicar a citotoxicidade dos complexos de ouro (BARNARD, 2007; BERTRAND, 2014).

Complexos de Ga^{III} também vem sendo estudados desde a década de 1990. O mecanismo de ação desses complexos ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que os íons Ga³⁺ se ligam a

transferrina e se acumulam em grandes quantidades no meio intracelular (ELLAHIOUI; PRASHAR; GÓMEZ-RUIZ, 2017). O complexo KP46 (Figura 3), tris(8-hidroxiquinolato)gálio(III), em sua formulação oral (NKP2235) está sendo testado clinicamente.

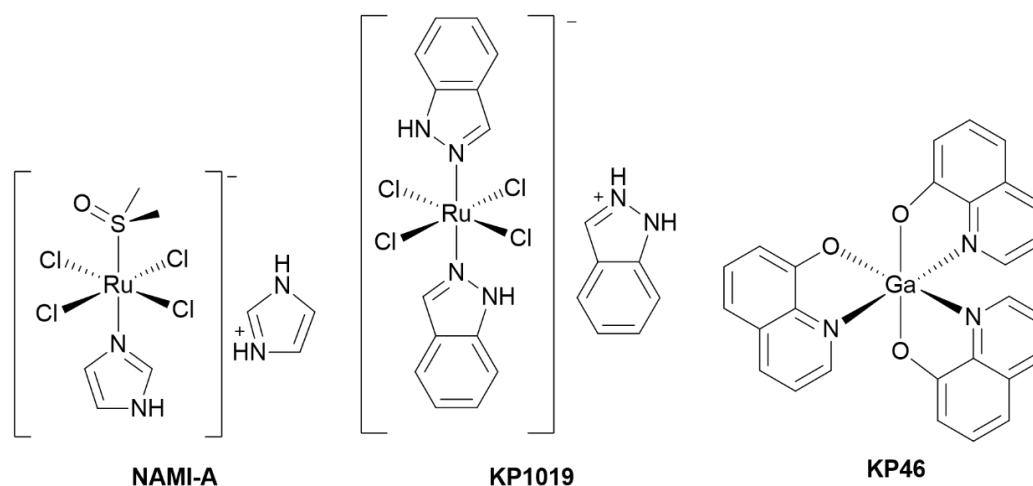


Figura 3 - Complexos de rutênio e gálio com promissora atividade antitumoral. **Fonte:** Autor.

Portanto, consideráveis avanços têm sido alcançados na pesquisa de complexos metálicos como potenciais agentes antitumorais nas últimas décadas, particularmente, quanto ao mecanismo de ação desses compostos. Esses avanços são de grande importância para o planejamento de novos metalo-fármacos, mais eficientes que os compostos de platina atualmente disponíveis.

1.4 Compostos de prata (I)

A prata e seus compostos são conhecidos por suas propriedades biológicas há séculos. As civilizações antigas já faziam uso das propriedades antimicrobianas da prata, ao armazenar a água e outras bebidas em vasilhames de prata. Desde 1880, solução de nitrato de prata tem sido utilizada em recém-nascidos como prevenção a cegueira causada por infecções microbianas (MEDICI, 2016, 2019).

Os complexos de prata são potenciais metalo-fármacos, o que é evidenciado pela atividade antibacteriana, antimicótica, antiparasitária, antitumoral e antimalárica observada para vários compostos (LIANG *et al*, 2018). A coordenação de uma molécula bioativa a Ag^I pode potencializar sua atividade. Por exemplo, a sulfadiazina de prata é um complexo no qual o íon Ag⁺ está ligado a um antibiótico sulfonamida. A sulfadiazina de prata foi descoberta em 1960,

é empregada como medicamento tópico no tratamento de queimaduras e pertence a Lista de Medicamentos Essenciais da OMS.

Embora o mecanismo de ação que os compostos de prata exercem seus efeitos tóxicos não seja totalmente conhecido, estudos mostram a liberação de íons Ag^+ , sendo a espécie biologicamente ativa (MEDICI, 2016, 2019). O mecanismo de ação dos íons Ag^+ envolve uma série de danos causados nas células bacterianas (Figura 4), tais como:

- i) O íon Ag^+ pode se coordenar a grupos tióis de proteínas e enzimas encontradas na superfície da parede celular, levando a desestabilização da membrana celular e bloqueio dos processos de síntese de ATP;
- ii) Os íons Ag^+ podem danificar a integridade e a permeabilidade da parede celular pela remoção de um elétron dos constituintes celulares e enzimas;
- iii) Perturbação da homeostase mitocondrial, causando a despolarização da membrana;
- iv) Interação com peptídeos e proteínas, especialmente com grupos tióis, levando a inativação de enzimas e desnaturação de proteínas;
- v) Interação com ácidos nucleicos, particularmente com as bases do DNA, ao invés da porção fosfato, interrompendo os processos de replicação celular;
- vi) Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

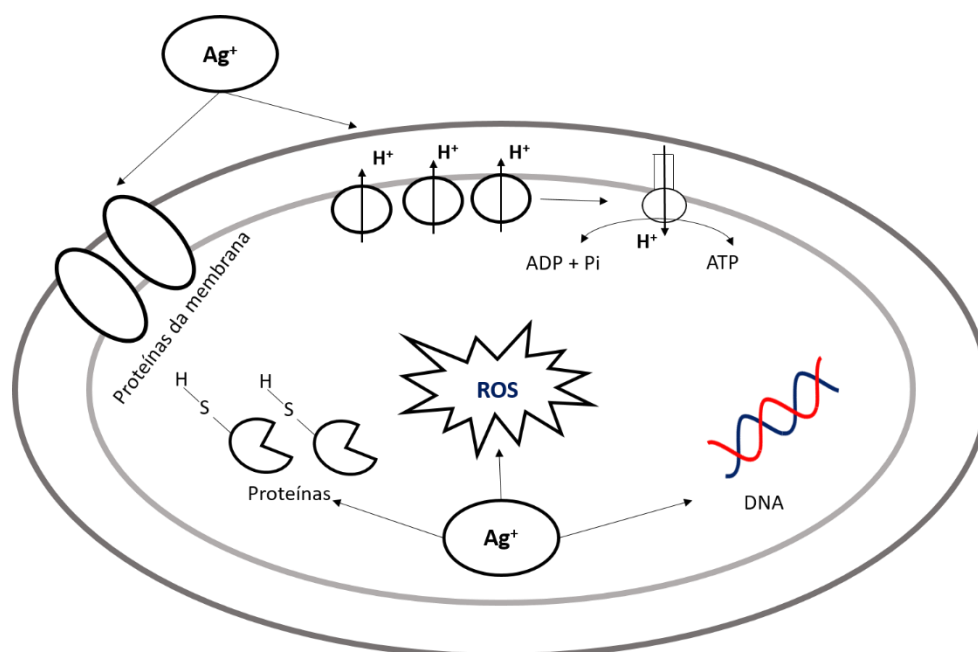


Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo de ação dos íons Ag^+ . **Fonte:** Adaptado de MIJNENDONCKX *et al.*, 2013.

Portanto, os efeitos tóxicos dos compostos de prata envolvem um mecanismo de ação complexo e múltiplos alvos, evidenciando a importância desses compostos no planejamento de novos metalo-fármacos. Além disso, a toxicidade da prata para humanos é considerada baixa, estudos demonstram que o corpo humano na presença de doses baixas de prata não sofre nenhum efeito tóxico, provavelmente devido a formação de AgCl (MEDICI *et al.*, 2016). Logo, o potencial antitumoral dos compostos de prata pode ser explorado com segurança razoável.

Nas últimas décadas, a atividade antitumoral de complexos de prata (I) tem recebido atenção de vários pesquisadores. Dentre os ligantes utilizados no planejamento de complexos de prata com potencial antitumoral, destacam-se os ligantes *N*-heterocíclicos (ex. 1,10-fenantrolina, polipiridinas), carbenos *N*-heterocíclicos (NHCs) e fosfinas (BANTI, 2013; MEDICI, 2016; LIANG, 2018).

Ali *et al.* (2013) sintetizaram e avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* de complexos de prata (I) contendo ligantes piridina 2,6-disubstituídos frente as linhagens tumorais HepG2 (fígado), A549 (pulmão), HT-29 (cólon) e MCF-7 (mama). Os compostos (Figura 5) são mais ativos que os ligantes livres contra todas as linhagens testadas. Além disso, o composto [AgL₁(NO₃)] foi mais ativo que o fármaco doxorrubicina nas células HepG2 (IC₅₀ = 1,52 μM), A549 (IC₅₀ = 1,41 μM) e HT-29 (IC₅₀ = 1,75 μM).

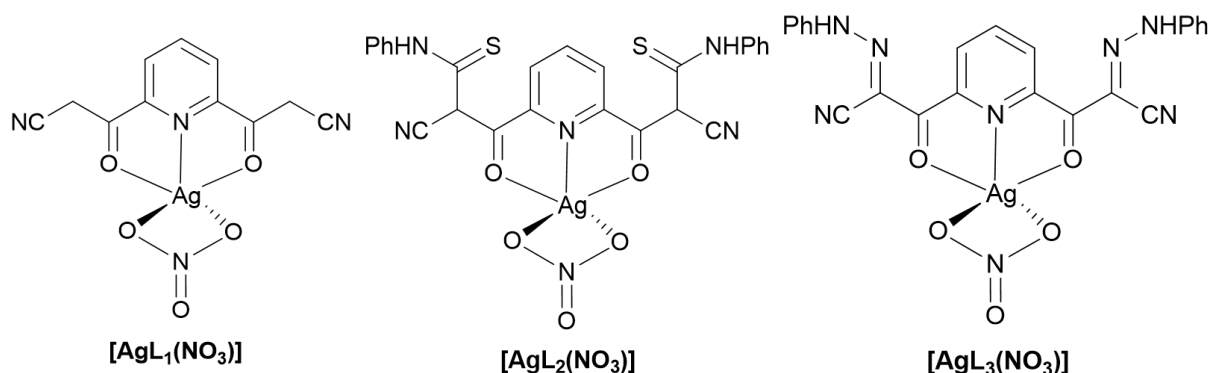


Figura 5 - Complexos de Ag^I com ligantes *N*-heterocíclicos sintetizados por Ali *et al.* **Fonte:** Autor.

O trabalho de Youngs *et al.* (2008) foi o primeiro a reportar a atividade antitumoral de complexos de prata contendo carbenos *N*-heterocíclicos Ag^I-NHC. Três complexos Ag^I-NHC derivados do 4,5-dicloroimidazol foram sintetizados e a atividade antitumoral *in vitro* avaliada contra linhagens tumorais de ovário (OVCAR-3), mama (MB157) e colo uterino (HeLa). Os compostos (Figura 6) apresentaram atividade contra as células de ovário e mama, particularmente, foram mais ativos nas células MB157 do que a cisplatina (IC₅₀ = 25 μM),

exibindo valores de IC_{50} na faixa de 8 – 20 μM . Estudos preliminares *in vivo* demonstraram que o composto mais promissor foi ativo contra células tumorais de ovário em um modelo xenogáfic.

Recentemente, Allison *et al.* (2017) avaliaram a atividade pré-clínica e o mecanismo de ação do complexo Ag^I -NHC Ag8 (Figura 6). O composto de prata apresentou promissora atividade contra a linhagem tumoral de ovário resistente a cisplatina (A2780cis/CP70), com valor de IC_{50} igual a $0,09 \pm 0,01 \mu M$, além de menor citotoxicidade frente a células não-tumorais ARPE-19 (retina), WI38 (pulmão) e PNT-2 (próstata). O mecanismo de ação do composto Ag8 demonstrou ser diferente daquele observado para a cisplatina. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de múltiplos alvos, tais como das enzimas tioredoxina redutase e topoisomerases I e II, que induzem a morte celular por apoptose. Além disso, Ag8 apresentou atividade antitumoral e baixa toxicidade *in vivo*.

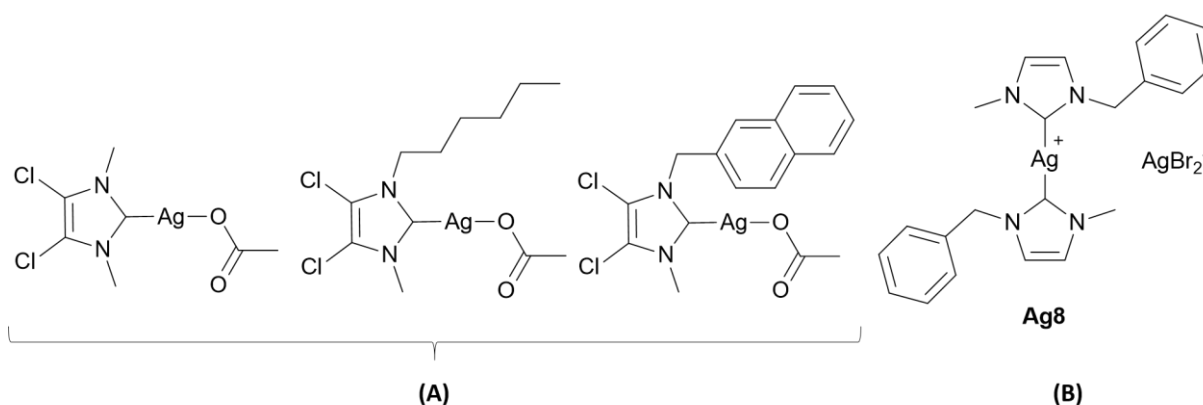


Figura 6 - Complexos Ag^I -NHC sintetizados por Young (A) e Allison (B). **Fonte:** Autor.

Engelbrecht *et al.* (2018) investigaram o potencial antitumoral do complexo de prata $[Ag(SCN)(PR_3)_2]$ (PR_3 = tris-4-metóxi fenilfosfina) contra a linhagem tumoral de esôfago SNO. O complexo de prata (Figura 7) demonstrou ser 14 vezes mais potente do que a cisplatina contra as células SNO, além de apresentar menor citotoxicidade em células não tumorais HDF-a (derme) e HEK-293 (rim). O composto induz a apoptose das células tumorais pelo mecanismo intrínseco que foi evidenciado pelo baixo nível de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), despolarização do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo *c* e clivagem de caspase-9. Além disso, os dados de toxicidade oral aguda demonstram que o composto de prata é bem tolerado *in vivo* (dose letal máxima igual a 1300 g/kg).

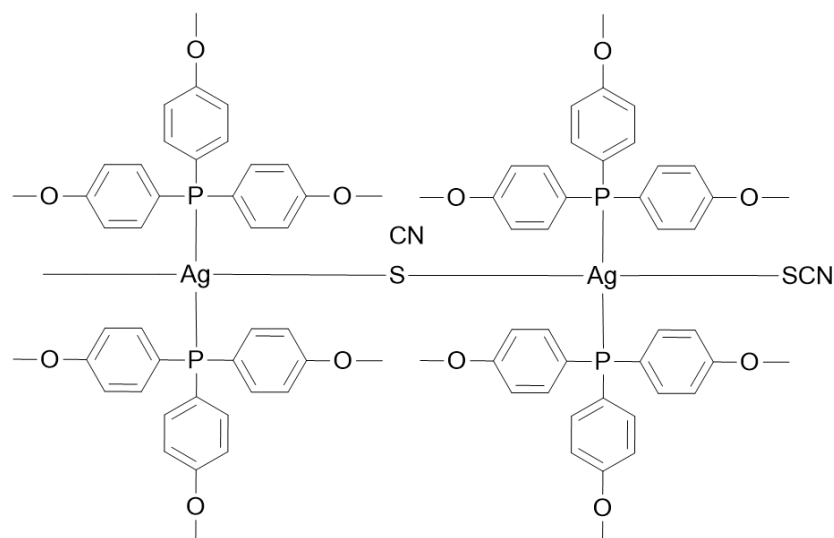


Figura 7- Complexo de Ag^I com fosfinas sintetizado por Engelbrecht *et al.* **Fonte:** Autor.

Em geral, o mecanismo de ação dos complexos de prata (I) demonstra ser diferente daquele observado para a cisplatina e análogos em termos de interação com o DNA, perturbação da membrana mitocondrial e inibição de múltiplos alvos, induzindo o mecanismo intrínseco de apoptose (MARLOYE *et al.*, 2016). Além disso, a eficiência da ação citotóxica desses complexos depende de vários fatores, como velocidade de liberação de íons Ag⁺, lipofilicidade, solubilidade e estabilidade em meio aquoso. Tais fatores podem ser modulados pela escolha dos ligantes com base em suas características estéricas e eletrônicas (MEDICI, 2016; LIANG, 2018).

1.5 Planejamento dos complexos de prata (I)

Os íons metálicos têm grande tendência de sofrer reações de troca de ligantes em solução aquosa. A velocidade em que essas reações ocorrem depende de vários fatores, tais como da energia de estabilização do campo cristalino (EECC), efeito quelato, tamanho dos íons, natureza dos ligantes, entre outros (JONES; THORNBAC, 2007). Em geral, o íon Ag^I forma complexos cineticamente lábeis, uma vez que íons metálicos d¹⁰ possuem EECC igual a 0. Porém, 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 Ag^I é um ácido de Pearson macio (PEARSON, 1963), portanto, o uso de ligantes contendo átomos doadores macios ou

intermediários (ex. S, P, N, C) é uma estratégia para reduzir a labilidade do complexo de prata (I).

A coordenação de ligantes quelantes é uma estratégia bem conhecida para modular as propriedades físico-químicas de complexos de prata (I), assim como incorporar ligantes que já são conhecidos por suas propriedades biológicas (MEDICI, 2016; LIANG, 2018). Além disso, ligantes quelantes também afetam a labilidade dos complexos metálicos. Em geral, a reação de substituição de um ligante quelante é mais lenta quando comparada a de um ligante monodentado. Esse efeito é explicado com base em dois fatores: a energia necessária para retirar o primeiro átomo coordenado e a probabilidade da reversão dessa primeira etapa. De modo geral, o efeito quelato cinético reduz a velocidade de reações de aquação por fatores de 20 a 10^5 (MIESSLER; TARR, 2003). O efeito quelato termodinâmico também é explorado no planejamento de complexos metálicos bioativos. Esse efeito torna os complexos quelatos mais estáveis termodinamicamente em relação aos seus análogos constituídos por ligantes monodentados (JONES, 2002).

Para que um metalo-fármaco exerça seu efeito citotóxico, este precisa alcançar seu alvo biológico dentro da célula. A internalização celular de um composto pode envolver diferentes vias através da membrana celular, incluindo difusão passiva, proteínas de transporte e endocitose. A identidade do íon metálico e dos ligantes afetam a taxa de internalização e a distribuição intracelular (PUCKETT; ERNST; BARTON, 2010). Desde o trabalho pioneiro de Berners-Price e Sadler (1988), o potencial antitumoral de complexos metálicos contendo fosfinas tem atraído relevante interesse da comunidade científica devido ao caráter lipofílico desses ligantes que pode auxiliar na passagem através da membrana celular, e consequentemente, aumentar a internalização celular do complexo.

1.5.1 Tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazonas são uma classe de compostos com estrutura geral $R^1R^2C=N-N(H)-C(=S)-NR^3R^4$. Essas bases de Schiff podem ser sintetizadas pela condensação de um aldeído ou cetona com uma tiossemicarbazida (CASAS; GARCÍA-TASENDE; SORDO, 2000). De modo geral, as tiossemicarbazonas têm atraído grande interesse devido a sua versatilidade de obtenção, além de baixo custo e alto rendimento de síntese (DU *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, as propriedades biológicas das tiossemicarbazonas (TSCs) têm sido extensivamente exploradas. As TSCs são desenvolvidas e aplicadas contra várias doenças, tais

como tuberculose, infecções virais, malária e câncer (BERALDO; GAMBINO, 2004). Particularmente, a atividade antitumoral das tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas desperta grande interesse da comunidade científica (Figura 8) (HEFFETER, 2019; MROZEK-WILCZKIEWICZ, 2019). Já em 1956, a atividade antiproliferativa da 2-formilpiridina tiossemicarbazona (FTSC) foi reportada contra células leucêmicas murinas (WALLACE *et al.*, 1956). Dentre as tiossemicarbazonas avaliadas em ensaios clínicos, a Triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona) já foi testada em mais de 30 ensaios clínicos de fase I e II (FINCH *et al.*, 2000). A Triapina apresentou ação promissora contra doenças hematológicas, porém, não apresentou atividade contra tumores sólidos. Assim, vários estudos de fase I também já foram realizados para testar o uso combinado da Triapina e outros quimioterápicos, tais como cisplatina (KUNOS *et al.*, 2017), gemcitabina (KARP *et al.*, 2008) e doxorrubicina (SCHELMAN *et al.*, 2009). Recentemente, duas novas tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas estão sendo avaliadas clinicamente. Em 2015, iniciou-se um estudo clínico de fase I com o composto COTI-2 para o tratamento de tumores ginecológicos avançados ou recorrentes (NCT02433626). A segunda TSC em estudos desde 2016 é a DpC (di-2-piridilcetona-4-ciclohexil-4-metil-3-tiossemicarbazona), a qual está sendo avaliada em pacientes com diferentes tipos de tumores avançados e resistentes (NCT02688101).

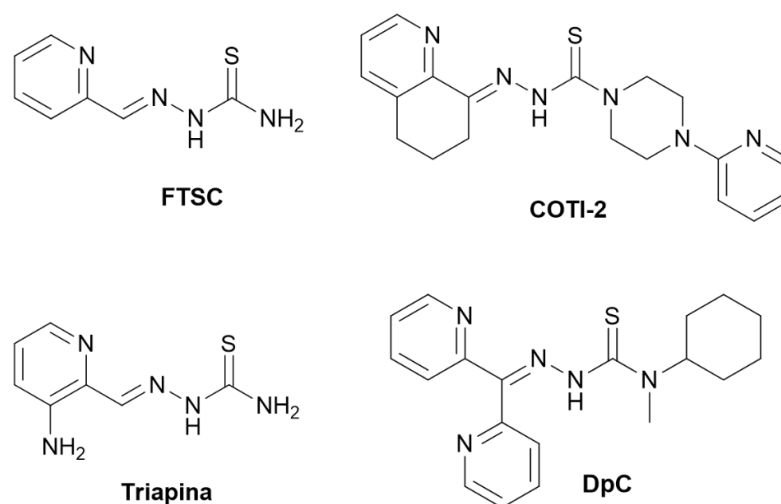


Figura 8 - Tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas com potencial atividade antitumoral. **Fonte:** Autor.

Os efeitos citotóxicos das TSCs são relacionados à sua capacidade de quelar íons metálicos (REJMUND *et al.*, 2018). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, vários estudos demonstram múltiplos alvos, principalmente, a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), uma enzima chave na síntese do DNA (YU *et al.*, 2011). Bem

como, a inibição das Topoisomerases (Topo), enzimas reguladoras da topologia do DNA durante a divisão celular (RAO *et al.*, 2009).

As TSCs são importantes ligantes *N,S*-doadores extensivamente utilizados no planejamento de novos metalo-fármacos e, em geral, seus complexos metálicos apresentam atividade antitumoral superior à dos ligantes livres. Uma variedade de complexos derivados de tiossemicarbazonas baseados nos metais cobre, gálio, níquel e paládio vêm sendo investigados como potenciais agentes antitumorais nas últimas décadas (BALACHANDRAN, 2018; DENG, 2018; QI, 2018; OLIVEIRA, 2019).

Recentemente, Gu *et al.* (2019) avaliaram a atividade antitumoral de complexos de cobre de fórmula geral $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L})(\text{Br})]$ e $[\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-Cu}^{\text{I}}(\text{L})_2(\text{Br})_3]$, $\text{L} = (\text{E})\text{-N,N-dimetil-2-(quinolinil-8-metileno)-hidrazinacarbotoamida}$ (Figura 9). Os compostos foram mais citotóxicos do que a cisplatina e o ligante tiossemicarbazona livre contra as células tumorais MCF-7 (mama), HeLa (colo uterino), A549 (pulmão) e A549cisR (resistente a cisplatina), exibindo valores de IC_{50} na faixa de 0,27 – 0,91 μM . Para efeito de comparação, a citotoxicidade de $[\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-Cu}^{\text{I}}(\text{L})_2(\text{Br})_3]$ também foi avaliada frente as células não-tumorais MRC-5 (fibroblasto pulmonar), um índice de seletividade igual a 3,8 foi obtido comparando os valores de IC_{50} para as células A549cisR e MRC-5. A emissão de fluorescência do complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-Cu}^{\text{I}}(\text{L})_2(\text{Br})_3]$ foi utilizada para investigar a localização intracelular na linhagem tumoral HeLa. Os resultados demonstraram que $[\text{Cu}^{\text{II}}_2\text{-Cu}^{\text{I}}(\text{L})_2(\text{Br})_3]$ é encontrado principalmente nas mitocôndrias, ao invés do núcleo e lisossomos das células HeLa. Além disso, o composto induziu a apoptose nas células HeLa mediada por alterações no potencial de membrana mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

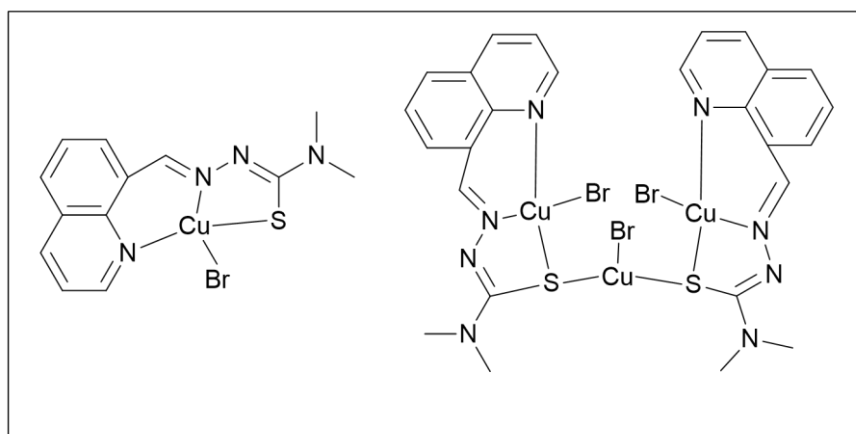


Figura 9 - Complexos de cobre derivados de tiossemicarbazonas sintetizados por Gu *et al.* **Fonte:** Autor.

Apesar da variedade de complexos metálicos derivados de tiossemicarbazonas com potencial antitumoral reportados na literatura, o estudo de complexos de prata (I) ainda é escasso. O único trabalho publicado é de Halim *et al.* (2019) que descreve a atividade antiproliferativa *in vitro* de compostos de prata (I) contendo ligantes tiossemicarbazonas e difenil(*p*-toluil)fosfina, Figura 10. Os compostos foram ativos frente as linhagens tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e colón (HT-29), com valores de IC₅₀ na faixa de 1,60 – 6,39 µM. Porém, o mecanismo de ação e potenciais alvos biológicos desses complexos ainda não foram investigados.

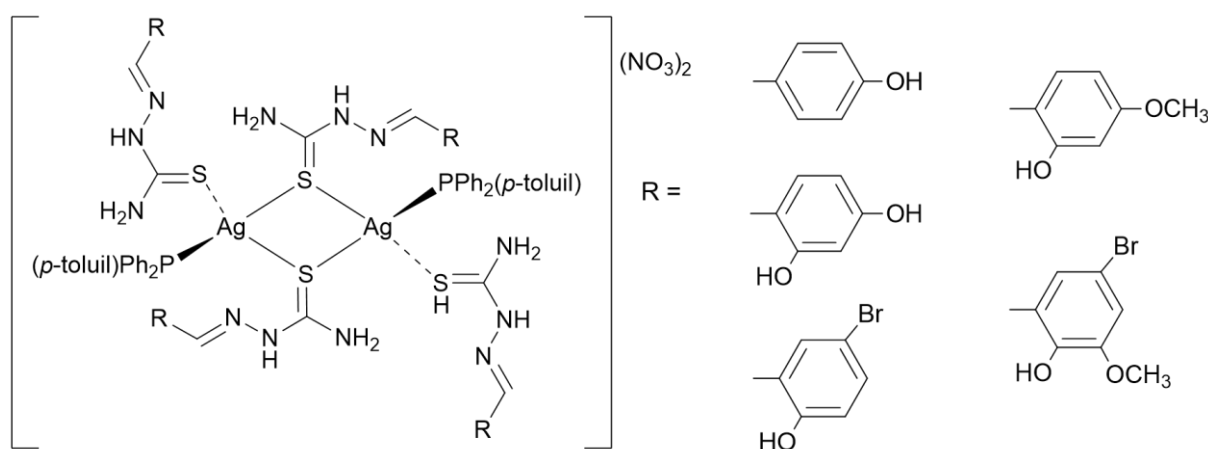


Figura 10 - Complexos de Ag^I derivados de tiossemicarbazonas sintetizados por Halim *et al.* **Fonte:** Autor.

1.5.2 1,10-Fenantrolina

1,10-Fenantrolina (phen) é um ligante N,N-bidentado clássico que teve um papel importante no desenvolvimento da Química de Coordenação. Phen pertence à família das α,α'-diiminas e devido a sua versatilidade e diversas aplicações biológicas, phen e seus derivados vêm sendo extensivamente estudados. Rigidez, planaridade e hidrofobicidade são as principais características estruturais da phen, sobretudo, a natureza planar explica sua capacidade de intercalação e/ou ligação nos sulcos do DNA e RNA (BENCINI; LIPPOLIS, 2010).

Complexos metálicos contendo 1,10-fenantrolina e seus derivados apresentam amplo espectro de atividade contra várias doenças incluindo câncer, infecções bacterianas e fúngicas (COYLE, 2003; LOBANA, 2014; NG, 2014; VIGANOR, 2017). Particularmente, esses complexos representam uma classe de compostos que demonstram um mecanismo de ação antitumoral diferente daquele observado para cisplatina e análogos principalmente em termos

de interação com o DNA. Estudos revelaram que esses complexos podem interagir com DNA por três principais modos: interações hidrofóbicas nos sulcos menores, intercalação parcial do ligante phen no sulco principal e interações de empilhamento π entre o metalintercalador e os pares de bases do DNA (ZEGLIS, 2007; LIU, 2011).

Complexos de prata (I) contendo phen e seus derivados já são bem conhecidos como potenciais agentes antifúngicos (COYLE, 2003; MCCANN, 2012; GANDRA, 2017). Entretanto, um número menor de trabalhos reporta o potencial antitumoral desses compostos (MEDICI, 2016; LIANG, 2018). Recentemente, Thornton *et al.* (2016) investigaram a atividade antimicrobiana e antitumoral de complexos de prata (I) binucleares $[\text{Ag}_2(\text{OOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO})]$ ($n = 1-10$) e seus derivados contendo o ligante 1,10-fenantrolina de fórmula geral $[\text{Ag}_2(\text{phen})_x(\text{OOC}-(\text{CH}_2)_y-\text{COO})] \cdot z\text{H}_2\text{O}$ ($x = 2$ ou 3 ; $y = 1-10$; $z = 1-4$). Os compostos apresentaram atividade contra cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e cepas fúngicas de *Candida albicans*. Os complexos de prata (I) derivados da phen (Figura 11) são mais ativos frente as células tumorais de mama (MCF-7) e de ovário (SKOV-3) do que seus precursores de prata (I) dicarboxilatos, exibindo valores de IC_{50} na ordem de $1 \mu\text{M}$. Estudos de interação com o DNA revelaram que os complexos derivados da phen demonstram um mecanismo de ação diferente daquele observado para seus precursores de prata (I) dicarboxilatos, de modo geral, não induzem danos ao DNA ou geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células.

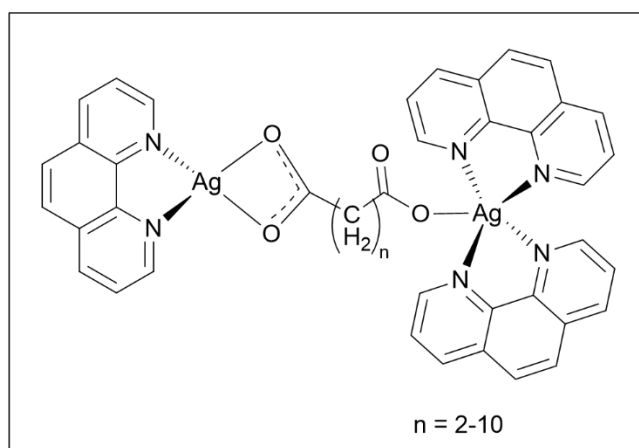


Figura 11 - Complexos de Ag^{I} derivados da phen sintetizados por Thornton *et al.* **Fonte:** Autor.

1.5.3 Fosfinas

As fosfinas têm sido amplamente utilizadas no planejamento de complexos metálicos devido à sua versatilidade e rica química de coordenação (MEIJBOOM, 2009; COLINA-VEGAS, 2019). Particularmente, complexos de ouro contendo ligantes fosfinas despertam interesse por seu potencial antitumoral (OTT, 2009). A atividade antitumoral de uma variedade de complexos de ouro (I) contendo fosfinas tem sido reportada na literatura, em geral, estudos de mecanismo de morte celular indicam que esses compostos induzem a apoptose através de danos a mitocôndria e inibição da enzima TrxR (REDDY, 2018; KIM, 2019). A auranofina (Figura 2), um composto de ouro (I) utilizado no tratamento da artrite reumatoide desde 1985, atualmente é objeto de investigação em testes clínicos para o tratamento de diferentes tipos de tumores tais como câncer de ovário, pulmão e leucemia. Estudos sobre o mecanismo de ação antitumoral da auranofina revelam a enzima tioredoxina redutase (TrxR) como seu alvo biológico principal (RODER; THOMSON, 2015).

O trabalho pioneiro de Berners-Price *et al.* (1988) apresentou a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de complexos de prata (I) do tipo $[Ag(P-P)_2]NO_3$ {P-P = 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe); 1,2-bis(dietilfosfino)etano (depe) e *cis*-1,2-bis(difenilfosfino)etileno (dppey)}. Desde então, um número crescente de complexos de prata (I) do tipo $[Ag(L)(PR_3)]$ (PR_3 = ligantes fosfinas) tem recebido atenção devido a sua citotoxicidade contra várias linhagens tumorais (ZARTILAS, 2009; POYRAZ, 2011; HUMAN, 2015; HUMAN-ENGELBRECHT, 2017; YILMAZ, 2017). A inserção de ligantes fosfinas no complexo metálico pode aumentar sua lipofilicidade, que pode levar ao aumento na sua citotoxicidade, mas também tornar o complexo menos solúvel em meio biológico. Dessa forma, a natureza do coligante é crucial para a eficiência dos complexos $[Ag(L)(PR_3)]$.

Vários estudos demonstram o potencial de complexos de prata contendo ligantes fosfinas em causar efeitos significativos nas mitocôndrias. Ligantes mitocondriotrópicos são utilizados como veículos para entregar de compostos na mitocôndria. Esses ligantes precisam apresentar características adequadas para interação com a membrana mitocondrial, tais como lipofilicidade suficiente e carga positiva. Os grupos trifenilfosfônio ($HPPH_3^+/alquil-PPh_3^+$) vêm sendo utilizados como ligantes mitocondriotrópicos devido a sua alta lipofilicidade e carga catiônica (HAN, 2014; ERXLEBEN, 2019). Logo, o uso de ligantes fosfinas deve desempenhar um papel importante no direcionamento dos complexos de prata (I) para as mitocôndrias. Por exemplo, o tratamento com o complexo $[Ag(SCN)(PR_3)]$ (PR_3 = tris-4-metóxi fenilfosfina) induziu o

aumento dos níveis de ROS, despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e liberação do citocromo c nas células tumorais SNO, desencadeando a apoptose via mitocondrial (ENGELBRECHT; MEIJBOOM; CRONJÉ, 2018).

Recentemente, Banti *et al.* (2016) investigaram a atividade antitumoral de complexos de prata (I) do tipo $[Ag(nim)(PR_3)_x]$ {nim = nimesulida; $x = 1, 2$; PR_3 = trifenilfosfina (tpp), tri(*p*-toluil)fosfina (p-tptp) e tri(*o*-toluil)fosfina (o-tptp)}, Figura 12. Os compostos apresentaram citotoxicidade superior da cisplatina contra as células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231, com valores médios de IC_{50} na faixa de 1 – 4,4 μ M. Os complexos causaram a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e liberação do citocromo c nas células tumorais MCF-7, ativando a apoptose por disfunção mitocondrial. Além disso, os compostos inibiram a enzima lipoxigenase (LOX), uma enzima distribuída principalmente nas mitocôndrias e responsável pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados em leucotrienos ou prostaglandinas (BANTI *et al.*, 2016).

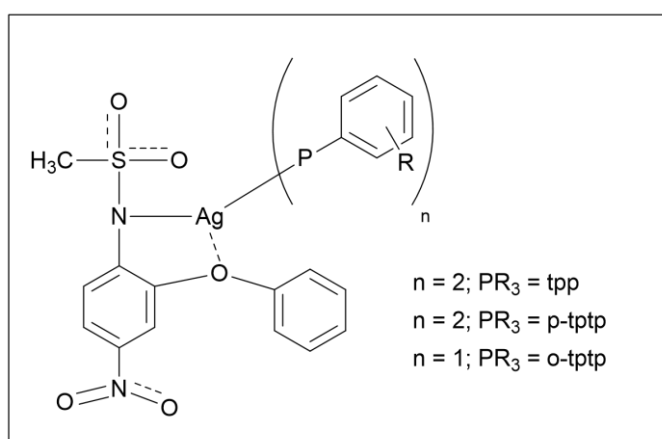


Figura 12 - Complexos de Ag^I contendo fosfinas sintetizados por Banti *et al.* **Fonte:** Autor.

1.6 Hipótese do trabalho

Nos últimos anos, nosso grupo tem investigado a atividade antileishmaniose de complexos ternários de prata (I) do tipo $[Ag(phen)(L)]X$ (phen = 1,10-fenantrolina; L = tiouréia, imidazolidina-2-tiona; $X = NO_3^-$, $CF_3SO_3^-$) contra cepas de *Leishmania amazonensis* e *chagasi* (SEGURA, 2014; ESPURI, 2019).

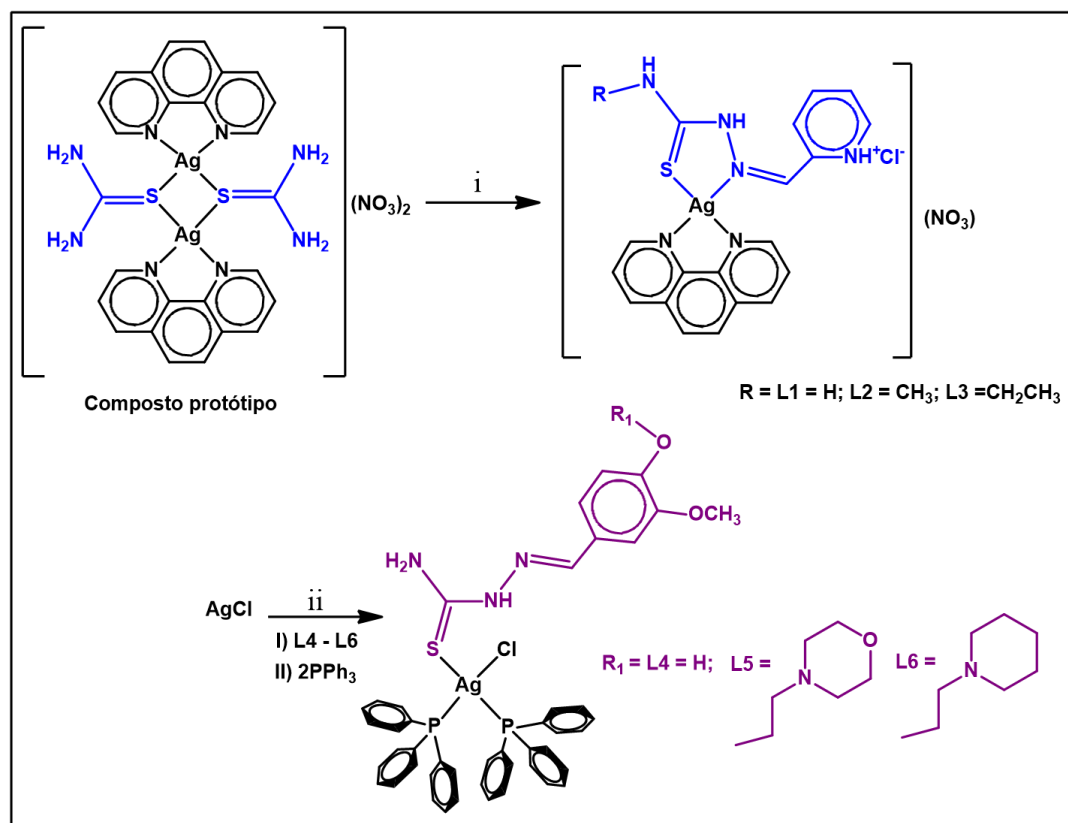
Parasitas *Leishmania* e células cancerosas compartilham características celulares e moleculares, tais como rápida proliferação celular, metástase, evasão do sistema imune,

mecanismos de resistência a fármacos, entre outras (KLINKERT, 2006; FUERTES, 2008). Neste contexto, tem se observado que compostos com atividade antitumoral também são ativos contra protozoários da leishmaniose (DOROSTI *et al.*, 2014). Por exemplo, a miltefosina é um fármaco utilizado no tratamento da leishmaniose, porém, foi primeiramente testada como agente antitumoral (SUNDAR; OLLIARO, 2007). Recentemente, complexos de Au^{I} e Ni^{II} com atividade dual contra células tumorais e protozoários da leishmaniose foram reportados na literatura (RAUF, 2015; CHAVES, 2017).

Visto a atividade inibitória dos complexos de prata (I) do tipo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L})]\text{X}$ frente a cepas de *Leishmania*, o potencial antitumoral de compostos de prata (I) análogos foi investigado nesse trabalho. O ligante tiouréia no composto protótipo foi substituído por tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas, as quais já são conhecidas por sua citotoxicidade em células tumorais, Esquema 1. Essa estratégia foi utilizada buscando um efeito sinérgico entre a porção $[\text{Ag}(\text{phen})]^+$ e os ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas, a fim de obter compostos mais ativos que as TSCs livres.

A atividade antitumoral de complexos de prata (I) do tipo $[\text{Ag}(\text{L})(\text{PR}_3)]$ reportada na literatura, nos motivou a estudar compostos de prata (I) contendo trifenilfosfina e ligantes tiossemicarbazonas derivados da vanilina, Esquema 1. A inserção do ligante PPh_3 aumenta a lipofilicidade do composto, em geral, complexos metálicos contendo fosfinas são menos solúveis em solventes polares. Neste contexto, foram utilizadas vanilina tiossemicarbazonas O-funcionalizadas com N-etilmorfolina e N-etilpiperidina visando melhor solubilidade em solventes polares.

Diante disso, o potencial antitumoral de complexos de prata do tipo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})]\text{NO}_3$ e $[\text{AgCl}(\text{L4-L6})(\text{PPh}_3)_2]$ foi investigado contra células tumorais de mama triplo negativo MDA-MB-231. Particularmente, o tratamento de tumores TNBC conta com opções limitadas e ineficientes de fármacos. Logo, os resultados sobre o mecanismo de ação desses compostos podem contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais contra tumores TNBC.



Esquema 1 – Planejamento dos complexos de prata (I): i) compostos derivados da 1,10-fenantrolina e 2-formilpiridina tiossemicarbazonas; ii) complexos derivados da trifenilfosfina e vanilina tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a síntese, caracterização e estudo do potencial antitumoral de complexos de prata contendo ligantes tiossemicarbazonas derivados da 2-piridinacarboxaldeído e 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído e coligantes 1,10-fenantrolina e trifenilfosfina. Os objetivos específicos do trabalho são:

- Síntese e caracterização dos ligantes 2-formilpiridina-*N*(4)-*R*-tiossemicarbazonas (*R* = H, CH₃ e CH₂CH₃), e 3-metoxi-4-*R*-benzaldeído tiossemicarbazonas (*R* = hidroxil, 2-(1-morfolinil)etóxi e 2-(1-piperidinil)etóxi);
- Síntese e caracterização dos complexos do tipo [Ag(phen)(L1-L3)]NO₃ (phen = 1,10-fenantrolina; L1 = 2-formilpiridina tiossemicarbazona; L2 = 2-formilpiridina-*N*(4)-metil-tiossemicarbazona; L3 = 2-formilpiridina-*N*(4)-etil-tiossemicarbazona);
- Síntese e caracterização dos complexos do tipo [AgCl(PPh₃)₂(L4-L6)] (PPh₃ = trifenilfosfina; L4 = 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona; L5 = 3-metoxi-4-[2-(1-morfolinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona; L6 = 3-metoxi-4-[2-(1-piperidinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona);
- Avaliar a estabilidade química dos complexos em solução;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos frente as células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e pulmão (A549);
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos complexos de prata (I) frente a linhagem não tumoral de mama MCF-10A e determinar o índice de seletividade (IS);
- Avaliar a internalização celular dos compostos nas células MDA-MB-231;
- Investigar o efeito dos complexos mais promissores na morfologia celular, no ciclo celular, na apoptose, no potencial de membrana mitocondrial e na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) da linhagem tumoral MDA-MB-231;
- Estudar a interação dos complexos mais promissores com o ctDNA.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os reagentes 2-piridinacarboxaldeído, 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído, cloridrato de 1-(2-cloroetil)morfolina, cloridrato de 1-(2-cloroetil)piperidina, tiossemicarbazida, 4-metil-3-tiossemicarbazida, 4-etil-3-tiossemicarbazida, cloreto de prata, nitrato de prata, 1,10-fenantrolina, trifenilfosfina (PPh₃) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes orgânicos foram utilizados como fornecidos.

3.2 Instrumentação

As medidas de análise elementar foram realizadas em um analisador elementar PerkinElmer 2400 Series II (Central Analítica da Universidade de São Paulo). Os espectros de IV foram obtidos no espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet iS5 na faixa de 4000-400 cm⁻¹ usando pastilhas de KBr. Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro 3200 QTRAP AB SCIEX com ionização por electrospray em modo positivo (Laboratório Multiusuário de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas do Instituto de Química Câmpus de Araraquara). Os espectros de RMN 1D e 2D foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III HD 14,1 T a 298 K (plataforma de multiusuários do Instituto de Química Câmpus de Araraquara). As amostras foram preparadas em dmso-d₆, e os deslocamentos químicos foram referenciados pelo sinal do solvente. As medidas de condutividade dos complexos foram realizadas em um condutivímetro DM-31 Digimed, utilizou-se soluções em dimetilformamida com concentração igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

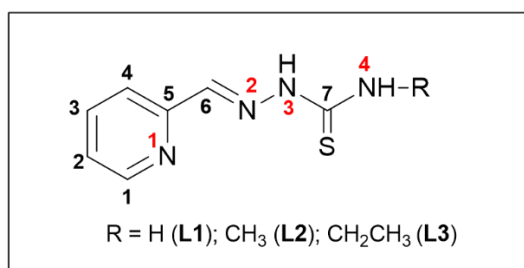
3.3 Difração de raios X de monocristal

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 MoK α ($\lambda = 0,71073$ Å), monocromatizada por cristal de grafite. As estruturas foram resolvidas por método direto usando o software SHELXT. Os dados foram refinados usando o método de mínimos quadrados de matriz completa com o software SHELXL, OLEX2. As representações gráficas das estruturas foram elaboradas com o software Mercury 4.1.

3.4 Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas

3.4.1 2-formilpiridina tiossemicarbazonas

Os ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas (**L1**, **L2**, **L3**) foram preparados conforme procedimento já descrito na literatura, com pequenas modificações (LOBANA *et al.*, 2010). A um balão contendo 20 mL de etanol, foram adicionados 10 mmol de 2-piridinacarboxaldeído e 10 mmol da tiossemicarbazida apropriada sob agitação. Após a adição de duas gotas de HCl concentrado, a mistura foi mantida sob refluxo por 6 horas. Em seguida, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente resultando na formação de sólidos amarelos microcristalinos. O produto foi filtrado, lavado com etanol frio e seco à vácuo.



2-formilpiridina tiossemicarbazona (L1) – Rendimento: 82%. IV (cm⁻¹): 3435 ν(NH); 3160 ν(NH); 1585 (νCN, δNH); 876 ν(C=S). ¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 11,80 (s, 1H, -N³H-); 8,46 e 8,93 (b, 1H, -N⁴H-); 8,61 (d, J = 4,8 Hz, 1H, H1); 8,32 (b, 1H, H4); 8,09 (s, 1H, H6); 7,99 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H3); 7,50 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H2). DEPTQ (DMSO-d₆, δ ppm): 178,53 (CS); 139,67 (CH=N).

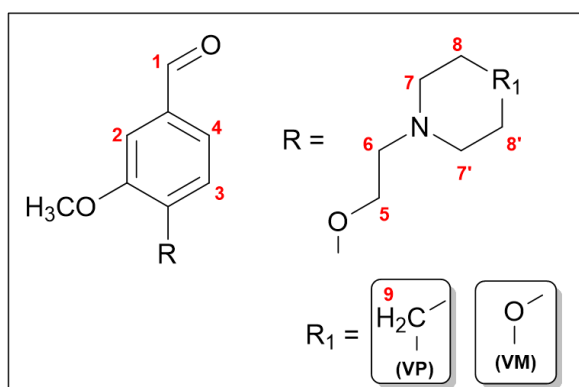
2-formilpiridina-N(4)-metil-tiossemicarbazona (L2) – Rendimento: 73%. IV (cm⁻¹): 3286 ν(NH); 3134 ν(NH); 1585 (νCN, δNH); 884 ν(C=S). ¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 11,70 (s, 1H, -N³H-); 8,68 (b, 1H, -N⁴H-); 8,55 (d, J = 4,8 Hz, 1H, H1); 8,26 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H4); 8,08 (s, 1H, H6); 7,84 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H3); 7,38 (t, J = 4,8 Hz, 1H, H2); 3,01 (d, J = 4,6 Hz, 3H, -CH₃). DEPTQ (DMSO-d₆, δ ppm): 177,96 (CS); 141,96 (CH=N).

2-formilpiridina-N(4)-etil-tiossemicarbazona (L3) – Rendimento: 78%. IV (cm⁻¹): 3284 ν(NH); 3135 ν(NH); 1585 (νCN, δNH); 876 ν(C=S). ¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 11,75 (s, 1H, -N³H-); 8,84 (b, 1H, -N⁴H-); 8,59 (d, J = 5,0 Hz, 1H, H1); 8,28 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H4); 8,09 (s, 1H, H6); 7,95 (t, J = 7,8 Hz, 1H, H3); 7,46 (b, 1H, H2), 3,60 (b, 2H); 1,16 (t, J = 7,0 Hz, 3H, -CH₂CH₃). DEPTQ (DMSO-d₆, δ ppm): 176,89 (CS); 139,94 (CH=N).

3.4.2 Vanilina tiossemicarbazonas

O ligante 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (**L4**) foi sintetizado conforme procedimento já descrito na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Os ligantes inéditos derivados do 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (**L5** e **L6**) foram sintetizados em duas etapas: i) funcionalização do grupo fenol e ii) condensação do aldeído apropriado com a tiossemicarbazida, conforme procedimento descrito abaixo.

i) 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (5,5 mmol) foi adicionado a um balão de fundo redondo contendo 2 g de K_2CO_3 e 30 mL de acetona. E então, 5,5 mmol de cloridrato de 1-(2-cloroetil)morfolina ou cloridrato de 1-(2-cloroetil)piperidina foi adicionado sob agitação a mistura. Após 12 horas de refluxo, a mistura de reação foi filtrada e o filtrado foi evaporado até volume inferior a 5 mL. Em seguida, 20 mL de clorofórmio foi adicionado ao sistema. Após múltiplas lavagens da fase orgânica com solução de 10% NaOH, a fase orgânica foi evaporada na capela. Os produtos foram secos à vácuo obtendo óleos viscosos.

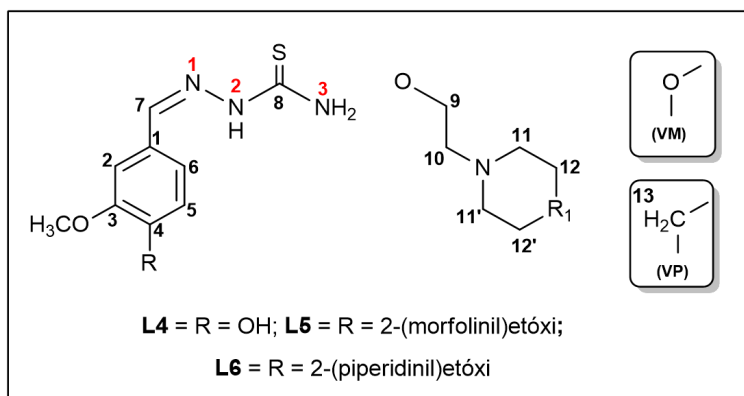


(3-metoxi-4-[2-(morfolinil)etóxi] benzaldeído) VM - Rendimento: 37% . 1H RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 9,83 (s, 1H, H1); 7,53 (dd, $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H, H4); 7,39 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H2); 7,20 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H3); 4,19 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H5); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 3,57 (t, $J = 4,5$ Hz, 4H, H8); 2,72 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H6); 2,48 (b, 4H, H7).

(3-metoxi-4-[2-(piperidinil)etóxi] benzaldeído) VP - Rendimento: 43% . 1H RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 9,82 (s, 1H, H1); 7,50 (dd, $J = 8,2; 1,8$ Hz, 1H, H4); 7,37 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H2); 7,15 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H3); 4,14 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H5); 3,82 (s, 3H, OCH_3); 2,66 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H6); 2,41 (b, 4H, H7); 1,47 (b, 4H, H8); 1,34 (b, 2H, H9).

ii) A um balão contendo 15 mL de H_2O e 5 mL de etanol, foram adicionados 2,24 mmol do benzaldeído funcionalizado (VM ou VP) e 2,24 mmol de tiossemicarbazida sob agitação. Após a adição de uma quantidade catalítica de HCl diluído, a mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 24 horas, o pH do meio reacional foi ajustado para 9

pela adição de K_2CO_3 , levando a precipitação de um sólido microcristalino. O produto foi filtrado, lavado com metanol frio e seco à vácuo.



3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (L4) - Rendimento: 81%. IV (KBr, cm^{-1}): 3278 $\nu(NH)$; 3155 $\nu(NH)$; 1600 $\nu(C=N)$; 780 $\nu(C=S)$. 1H RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 11,26 (s, 1H, =N-NH-), 9,49 (s, 1H, OH), 8,11 e 7,96 (s, 2H, NH_2), 7,93 (s, 1H, HC=N), 7,47 (d, $J = 18$ Hz, 1H, H2), 7,02 (dd, $J = 8,2; 1,8$ Hz, 1H, H6), 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H5), 3,82 (s, 3H, OCH_3). DEPTQ (DMSO- d_6 , δ ppm): 177,38 (C=S), 148,84 (C4), 148,14 (C3), 142,97 (HC=N), 125,64 (C1), 122,44 (C6), 115,24 (C5), 109,27 (C2), 55,81 (OCH_3).

3-metoxi-4-[2-(1-morfolinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona (L5)·3H₂O- Rendimento: 72 %. Anal. Calc. para $C_{15}H_{28}N_4O_6S$ (%): C, 45,90; H, 7,19; N, 14,28. Experimental (%): C, 45,87; H, 6,88; N, 14,17. IV (KBr, cm^{-1}): 3290 $\nu(NH)$; 3170 $\nu(NH)$; 1600 $\nu(C=N)$; 766 $\nu(C=S)$. 1H RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 11,31 (s, 1H, =N-NH-), 8,16 e 8,02 (s, 2H, NH_2), 7,96 (s, 1H, HC=N), 7,51 (d, $J=1,8$ Hz, 1H, H2), 7,11 (dd, $J= 8,4; 1,8$ Hz, 1H, H6), 6,99 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H, H5), 4,09 (t, $J= 6,0$ Hz, 2H, H9), 3,81 (s, 3H, OCH_3), 3,57 (t, $J= 4,5$ Hz, 4H, H12), 2,69 (t, $J= 6,0$ Hz, 2H, H10), 2,46 (b, 4H, H11). DEPTQ (DMSO- d_6 , δ ppm): 177,53 (C=S), 149,80 (C4), 149,32 (C3), 142,52 (HC=N), 127,10 (C1), 122,17 (C6), 112,53 (C5), 108,79 (C2), 66,19 (C9), 66,13 (C12), 56,98 (C10), 55,80 (OCH_3), 53,71 (C11).

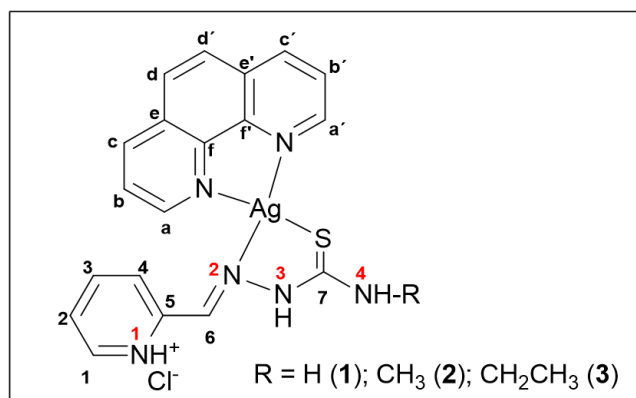
3-metoxi-4-[2-(1-piperidinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona (L6)·3H₂O- Rendimento: 83 %. Anal. Calc. para $C_{16}H_{30}N_4O_5S$ (%): C, 49,21; H, 7,74; N, 14,35. Experimental (%): C, 49,05; H, 7,77; N, 14,14. IV (KBr, cm^{-1}): 3290 $\nu(NH)$; 3170 $\nu(NH)$; 1598 $\nu(C=N)$; 758 $\nu(C=S)$. 1H RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 11,31 (s, 1H, =N-NH-), 8,15 e 8,02 (s, 2H, NH_2), 7,95 (s, 1H, HC=N), 7,51 (d, $J= 1,8$ Hz, 1H, H2), 7,11 (dd,

$J = 8,4$; $1,8$ Hz, $1H$, H_6), $6,98$ (d, $J = 8,4$ Hz, $1H$, H_5), $4,07$ (t, $J = 6,0$ Hz, $2H$, H_9), $3,81$ (s, $3H$, OCH_3), $2,65$ (t, $J = 6,0$ Hz, $2H$, H_{10}), $2,43$ (b, $4H$, H_{11}), $1,48$ (q, $J = 6,0$ Hz, $4H$, H_{12}), $1,37$ (b, $2H$, H_{13}). DEPTQ (DMSO- d_6 , δ ppm): $177,51$ (C=S), $149,85$ (C4), $149,28$ (C3), $142,53$ (HC=N), $127,01$ (C1), $122,18$ (C6), $112,47$ (C5), $108,77$ (C2), $66,31$ (C9), $57,32$ (C10), $55,78$ (OCH_3), $54,48$ (C11), $25,57$ (C12), $23,93$ (C13).

3.5 Síntese dos complexos de prata (I)

3.5.1 Complexos do tipo $[Ag(phen)(L1-L3)](NO_3)$

O ligante 1,10-fenantrolina ($0,78$ mmol) dissolvido em 3 mL de acetonitrila, foi adicionado a um balão contendo quantidade equimolar de $AgNO_3$ dissolvido em 3 mL de acetonitrila. A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente, e imediatamente observou-se a formação de uma suspensão amarela. Após 10 minutos de agitação, $0,78$ mmol de 2-formilpiridina- $N(4)$ -tiossemicarbazona (L1-L3) dissolvido em 5 mL de metanol foi adicionado ao balão. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 1 hora, levando a formação de um precipitado amarelo. O produto foi filtrado, lavado com etanol frio e seco à vácuo.



$[Ag(phen)(L1)](NO_3) \cdot HCl \cdot 2H_2O$ (1). Rendimento: 85%. Anal. calc. para $C_{19}H_{21}AgClN_7O_5S$ (%): C: 37,86; H: 3,51; N: 16,27. Experimental (%): C: 37,31; H: 3,27; N: 16,16. $\Lambda_M = 60,54$ $\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$. ESI-MS: m/z para $[Ag(phen)(L1)]^+$: 468,00. IV (cm^{-1}): 1590 (ν_{CN} , δ_{NH}); 1384 (ν_{NO_3}); 860 ($\nu_{C=S}$); 726 ($\gamma_{CH_{ar}}$). 1H RMN (DMSO- d_6 ; δ ppm): $12,34$ (s, $1H$, $-N^3H-$); $9,17$ e $8,93$ (b, $1H$, $-N^4H-$); $9,10$ (dd, $J = 1,6$; $4,5$ Hz, $2H$, $H_{a,a'}$); $8,70$ (dd, $J = 1,6$; $8,1$ Hz, $2H$, $H_{c,c'}$); $8,62$ (d, $J = 4,6$ Hz, $1H$, H_1); $8,30$ (d, $J = 8,0$ Hz, $1H$, H_4); $8,13$ (b, $2H$, $H_{d,d'}$); $8,17$ (b,

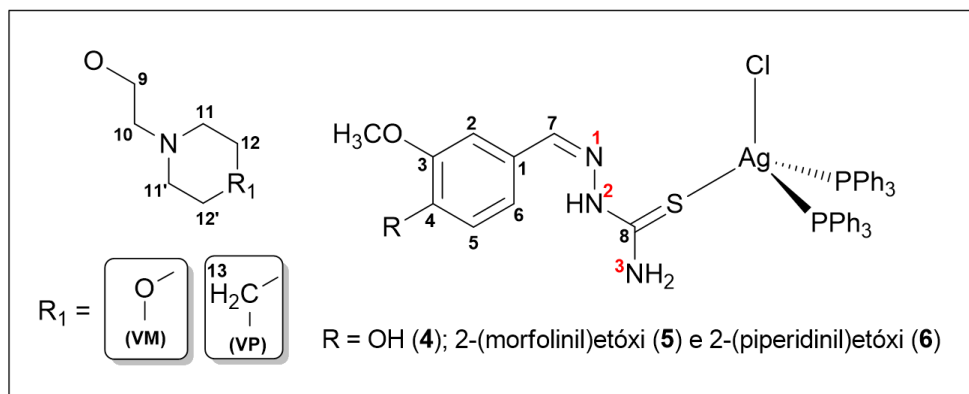
1H, H6); 7,97 (m, 2H, Hb,b'); 7,90 (t, = 8,0 Hz, 1H, H3); 7,46 (t, 1H, H2). DEPTQ (DMSO-d6; δ ppm): 174,35 (CS); 146,83 (CH=N).

[Ag(phen)(L2)](NO3)·HCl·CH3OH (2). Rendimento: 36%. Anal. calc. para C₂₁H₂₃AgClN₇O₄S (%): C: 41,16; H: 3,78; N: 16,00. Experimental (%): C: 41,12; H: 3,74; N: 15,37. $\Lambda_M = 62,95 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. ESI-MS: m/z para [Ag(phen)(L2)]⁺: 482,04. IV (cm⁻¹): 1555 (ν_{CN} , δ_{NH}); 1384 (ν_{NO_3}); 860 ($\nu_{\text{C}=\text{S}}$); 726 ($\gamma_{\text{CH}_{\text{ar}}}$). ¹H RMN (DMSO-d6; δ ppm): 12,09 (b, 1H, -N³H-); 9,18 (b, 1H, -N⁴H-); 9,13 (dd, J = 1,6; 4,5 Hz, 2H, Ha,a'); 8,75 (dd, J = 1,6; 8,1 Hz, 2H, Hc,c'); 8,59 (b, 1H, H1); 8,27 (b, 1H, H4); 8,18 (s, 2H, Hd,d'); 8,10 (b, 1H, H6); 8,01 (m, 2H, Hb,b'); 7,89 (b, 1H, H3); 7,43 (b, 1H, H2); 3,15 (b, 3H, -CH₃). DEPTQ (DMSO-d6; δ ppm): 175,18 (CS); 145,85 (CH=N).

[Ag(phen)(L3)](NO3)·HCl·2H2O (3). Rendimento: 61%. Anal. calc. para C₂₁H₂₅AgClN₇O₅S (%): C: 39,98; H: 3,99; N: 15,54. Experimental (%): C: 39,64; H: 3,85; N: 14,83. $\Lambda_M = 55,05 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. ESI-MS: m/z para [Ag(phen)(L3)]⁺: 496,02. IV (cm⁻¹): 1540 (ν_{CN} , δ_{NH}); 1384 (ν_{NO_3}); 860 ($\nu_{\text{C}=\text{S}}$); 726 ($\gamma_{\text{CH}_{\text{ar}}}$). ¹H RMN (DMSO-d6; δ ppm): 11,99 (s, 1H, -N³H-); 9,15 (b, 1H + 2H, -N⁴H + Ha,a'); 8,79 (b, 2H, Hc,c'); 8,57 (b, 1H, H1); 8,24 (b, 1H, H4); 8,19 (s, 2H, Hd,d'); 8,11 (b, 1H, H6); 8,03 (m, 2H, Hb,b'); 7,91 (b, 1H, H3); 7,44 (b, 1H, H2); 3,66 (b, 2H, -CH₂CH₃); 1,16 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₂CH₃). DEPTQ (DMSO-d6; δ ppm): 174,10 (CS); 145,07 (CH=N).

3.5.2 Complexos do tipo [AgCl(PPh₃)₂(L4-L6)]

A um balão contendo 0,355 mmol de AgCl suspenso em 10 mL de acetonitrila, foi adicionado 0,355 mmol da tiossemicarbazona (L4-L6) apropriada sob agitação. A mistura foi mantida sob agitação magnética à 50°C por 24 horas. Após este período, 0,71 mmol de trifetilfosfina foi adicionado ao balão, e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos resultando em um produto solúvel em acetonitrila. A solução foi armazenada na ausência de luz. Após a evaporação do solvente, para o composto **4** foi obtido um sólido branco microcristalino. Monocristais foram obtidos para os complexos **5** e **6** após evaporação do solvente, os quais foram isolados por filtração e secos.



[AgCl(PPh₃)₂(VTSC)] (4) - Rendimento: 40%. Anal. Calc. para C₄₅H₄₁AgClN₃O₂P₂S (%): C, 60,51; H, 4,63; N, 4,70. Experimental (%): C, 59,94; H, 4,77; N, 4,69. IV (KBr, cm⁻¹): 1598 ν(C=N); 1095 ν(P-CPh); 745 ν(C=S); 691 (γ_{anel}). ¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 11,62 (s, 1H, =N-NH-), 9,53 (s, 1H, OH), 8,48 e 8,19 (s, 2H, NH₂), 8,00 (s, 1H, HC=N), 7,50 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H₂), 7,44 (m, 6H, PPh₃), 7,34 (m, 24H, PPh₃), 7,04 (dd, J = 8,0; 1,8 Hz, 1H, H₆), 6,79 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H_{5van}), 3,83 (s, 3H, OCH₃). DEPTQ (DMSO-d₆, δ ppm): 175,97 (C=S), 149,06 (C₄), 148,15 (C₃), 144,15 (HC=N), 133,57 (CH PPh₃), 133,20 (C_q PPh₃), 130,13 (CH PPh₃), 128,91 (CH PPh₃), 125,37 (C₁), 122,68 (C₆), 115,23 (C₅), 109,34 (C₂), 55,79 (OCH₃).

[AgCl(PPh₃)₂(VMTSC)] (5) - Rendimento: 48%. Anal. Calc. para C₅₁H₅₂AgClN₄O₃P₂S (%): C, 60,87; H, 5,21; N, 5,57. Experimental (%): C, 58,08; H, 5,20; N, 5,38. IV (KBr, cm⁻¹): 1600 ν(C=N); 1095 ν(P-CPh); 745 ν(C=S); 691 (γ_{anel}). ¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 11,60 (s, 1H, =N-NH-), 8,44 e 8,19 (s, 2H, NH₂), 8,01 (s, 1H, HC=N), 7,53 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H₂), 7,45 (m, 6H, PPh₃), 7,36 (m, 24H, PPh₃), 7,13 (dd, J = 8,4; 1,8 Hz, 1H, H₆), 6,99 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H₅), 4,10 (t, J = 4,5 Hz, 2H, H₉), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,57 (t, J = 4,5 Hz, 4H, H₁₂), 2,69 (t, J = 6,0 Hz, 2H, H₁₀), 2,47 (b, 2H, H₁₁). DEPTQ (DMSO-d₆, δ ppm): 176,40 (C=S), 149,95 (C₄), 149,30 (C₃), 143,50 (HC=N), 133,41 (CH PPh₃), 133,28 (C_q PPh₃), 130,07 (CH PPh₃), 128,84 (CH PPh₃), 126,87 (C₁), 122,32 (C₆), 112,53 (C₅), 108,88 (C₂), 66,19 (C₉), 66,17 (C₁₂), 56,95 (C₁₀), 55,78 (OCH₃), 53,68 (C₁₁).

[AgCl(PPh₃)₂(VPTSC)] (6) - Rendimento: 53%. Anal. Calc. para C₅₄H₅₇AgClN₅O₂P₂S (%): C, 62,04; H, 5,50; N, 6,70. Experimental (%): C, 61,92; H, 5,48; N, 6,54. IV (KBr, cm⁻¹): 1600 ν(C=N); 1095 ν(P-CPh); 745 ν(C=S); 691 (γ_{anel}). ¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 11,73 (s, 1H, =N-NH-), 8,54 e 8,26 (s, 2H, NH₂), 8,03 (s, 1H, HC=N), 7,53 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H₂), 7,43 (m, 6H, PPh₃), 7,33 (m, 24H, PPh₃), 7,13 (dd, J = 8,4; 1,8 Hz, 1H,

H6), 7,00 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H5), 4,08 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H9), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 2,66 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H10), 2,44 (b, 4H, H11), 1,49 (q, $J = 6$ Hz, 4H, H12), 1,37 (b, 2H, H13). DEPTQ (DMSO-d₆, δ ppm): 176,03 (C=S), 150,03 (C4), 149,28 (C3), 143,79 (HC=N), 133,44 (CH PPh₃), 133,16 (Cq PPh₃), 130,10 (CH PPh₃), 128,81 (CH PPh₃), 126,76 (C1), 122,42 (C6), 112,43 (C5), 108,82 (C2), 66,30 (C9), 57,31 (C10), 55,77 (OCH₃), 54,46 (C11), 25,56 (C12), 23,92 (C13).

3.6 Ensaios de estabilidade em solução

A estabilidade dos complexos **1–3** foi avaliada em DMSO-d₆, tampão Tris-HCl (Tris-HCl 5 mM e NaCl 50 mM, pH 7,4) e DMEM. Espectros de RMN de ¹H dos compostos em DMSO-d₆ foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III HD (14,1 T) a 298 K em 0, 24 e 48 h após o preparo das amostras. Espectros de UV-Vis do composto **1** em tampão Tris-HCl (2×10^{-5} mol L⁻¹, 2% DMSO) foram registrados em 0, 24 e 48 h após o preparo da solução. O complexo **1** foi solubilizado em DMEM (1 mg mL⁻¹; 5% DMSO) e imagens da solução foram registradas em 0, 24 e 48 h após a exposição à luz ambiente.

A estabilidade dos complexos **4–6** foi avaliada em DMSO-d₆/D₂O (80:20%, v/v) e tampão Tris-HCl (Tris-HCl 5 mM e NaCl 50 mM, pH 7,4). Espectros de RMN de ¹H dos compostos em DMSO-d₆/D₂O foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III HD (14,1 T) a 298 K em 0, 24 e 48 h após o preparo das amostras. Espectro de UV-Vis dos compostos em tampão Tris-HCl (2×10^{-5} mol L⁻¹, 2% DMSO) foram registrados em 0, 24 e 48 h após o preparo das soluções.

3.7 Atividade citotóxica *in vitro*

Os experimentos por citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) em colaboração com a Dra. Amanda Blaque Becceneri, sob supervisão da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti no Departamento de Gerontologia da UFSCar. E os ensaios por Microscopia de Fluorescência Confocal foram realizados no Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal (FOAr/Unesp) sob supervisão da Dra. Paula Aboud Barbugli.

3.7.1 Diluição dos compostos

Soluções estoque dos compostos de prata e camptotecina foram preparadas em DMSO, e a cisplatina foi solubilizada em DMF. Para todos os ensaios, os compostos foram diluídos em meio de cultura e a concentração final de DMSO ou DMF foi inferior a 0,5%.

3.7.2 Linhagens celulares

Nesse trabalho foram utilizadas três linhagens tumorais humanas, A549 (carcinoma pulmonar), MCF-7 (adenocarcinoma de mama – hormônio sensível) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo negativo), e uma linhagem não tumoral humana MCF-10A (células epiteliais de mama). As células MCF-7 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foram doadas pela Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti do Departamento de Gerontologia da UFSCar, as células A549 foram doadas pelo Prof. Dr. Alzir Batista Azevedo do Departamento de Química da UFSCar.

As células tumorais A549, MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), sulfato de gentamicina (50 mg L^{-1}) e anfotericina B (2 mg L^{-1}). A linhagem não tumoral MCF-10A foi cultivada em DMEM/F12 (Vitrocell) contendo 5% de soro de cavalo, EGF ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$), hidrocortisona ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$), insulina ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 UI mL^{-1}) e estreptomicina (100 mg mL^{-1}). As células foram mantidas em uma incubadora úmida a 37°C e 5% de CO_2 .

3.7.3 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT

A atividade citotóxica dos compostos frente as células A549, MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foi avaliada através do ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este ensaio tem como princípio quantificar a viabilidade celular pela atividade mitocondrial através da formação de cristais de formazan (produto formado pela redução do MTT) que ocorre principalmente na mitocôndria de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células ($1,5 \times 10^4$ células/ $100 \mu\text{L}$) foram semeadas em placas de 96 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 em uma incubadora. Em seguida, o meio foi

removido, as células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos e incubadas por 48 horas. Nos poços do controle negativo, o veículo utilizado na diluição dos compostos (0,5% DMSO) foi adicionado. Após o tratamento, o meio foi removido e uma solução de MTT (PBS, 1 mg mL⁻¹, GoldBio) foi adicionada (50 µL/poço). As placas foram incubadas por 4 horas, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol (100 µL). As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas (BioTek, Epoch) em 570 nm. O valor de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinado a partir de curvas dose-resposta utilizando o software Graph Pad Prism 6.0. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7.4 Quantificação celular de prata por GFAAS

Ensaio de quantificação de Ag foram realizados com a linhagem tumoral MDA-MB-231 após a incubação com os complexos **1–6** a fim de determinar a porcentagem de internalização celular.

As células MDA-MB-231 (2 x 10⁵ células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços estéreis e mantidas em uma estufa de cultura de células por 24 horas. No dia seguinte, as células foram incubadas com 50 µM dos compostos **1–3** por 6 horas e 12 µM dos compostos **4–6** por 3 horas. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. As células foram ressuspensas em DMEM e contadas utilizando uma câmara de Neubauer. E então, as amostras (suspensão) foram diluídas em água deionizada, homogeneizadas em um agitador vortex e alíquotas de 1–5 µL analisadas. As análises foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica de forno de grafite com fonte contínua de alta resolução Analytik Jena ContrAA 700. Para considerar os efeitos da matriz, a concentração de Ag também foi determinada em amostras de células contendo as soluções iniciais dos compostos **1–3** (50 µM) e **1–3** (12 µM). Os resultados são expressos como a porcentagem de internalização de Ag (Apêndice 20).

Uma solução de trabalho contendo 50 µg L⁻¹ de Ag foi preparada diariamente a partir da diluição de uma solução estoque padrão 1000 mg L⁻¹ (SpecSol®, QUIMLAB, Brasil) e acidificada com 1,0% (v / v) de solução de HNO₃. A solução do branco era 1,0% (v/v) de HNO₃. A calibração externa foi adotada. A calibração foi realizada pela adição de alíquotas apropriadas da solução de trabalho para obter 50, 100, 150, 250, 350, 500 e 750 pg de Ag.

3.7.5 *Análise da morfologia celular*

As células MDA-MB-231 e MCF-10A ($0,4 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora. Em seguida, o meio foi removido e as células tratadas com os complexos **1** (5, 10 e 20 µM) e **4** (6, 12 e 24 µM) por 48 horas. Alterações na morfologia celular foram observadas em um microscópio invertido (LABOMED TCM 400) com amplificação de 10x, e as imagens foram capturadas com uma câmera LABOMED iVu5100. As células tratadas foram comparadas às células do controle negativo (não tratadas).

3.7.6 *Análise do ciclo celular*

As células MDA-MB-231 (1×10^5 células por poço) foram semeadas em placas de 12 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora. Em seguida, o meio foi removido e as células tratadas com os complexos **1** e **4** na concentração do IC₅₀ por 48 horas. As células foram removidas das placas, centrifugadas e lavadas com PBS. E então, o pellet de células foi ressuspensionado em etanol 70% frio e as amostras armazenadas a -20°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, as células ressuspensas em solução de PBS contendo RNase A ($0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma) e PI ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma) e incubadas a 37 ° C por 30 minutos. Em seguida, o conteúdo de DNA foi determinado no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) e os dados analisados com o software CSampler.

3.7.7 *Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)*

Alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células MDA-MB-231 foram analisadas por citometria de fluxo empregando o kit BD MitoScreen (BD Biosciences). As células (1×10^5 células por poço) foram semeadas em placas de 12 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora. No dia seguinte, o meio foi removido e as células tratadas com os complexos **1** (10, 20 e 40 µM) e **4** (6, 12 e 24 µM) por 4 horas. Após a incubação, as células foram removidas das placas, lavadas com PBS e centrifugadas. Em seguida, as células foram incubadas com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) a 37 ° C por 15 minutos no escuro. Então, as

células foram lavadas com PBS, ressuspensas em tampão e analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) usando o software CSampler.

3.7.8 *Deteção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular*

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pelos compostos **1** e **4** foi investigada nas células MDA-MB-231 utilizando a sonda H₂DCFDA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, Invitrogen). As células ($0,4 \times 10^5$ células por poço) foram semeadas em placas de 24 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora. No dia seguinte, o meio foi removido e as células tratadas com os complexos **1** (5, 10 e 20 µM) e **4** (6 e 12 µM) por 48 e 24 horas, respectivamente. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram coradas com uma solução de 10 µM de H₂DCFDA (Invitrogen) em PBS. Após a incubação em estufa a 37°C por 20 minutos na ausência de luz, as células foram examinadas com um Microscópio de Fluorescência Confocal Zeiss LSM800 no Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal (FOAr/Unesp) sob supervisão da Dra. Paula Aboud Barbugli.

3.7.9 *Ensaio de marcação com Hoechst 33342/iodeto de propídio*

As células MDA-MB-231 ($0,4 \times 10^5$ células por poço) foram semeadas em placas de 24 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora. Em seguida, o meio foi removido e as células tratadas com os complexos **1** (5, 10 e 20 µM) e **4** (6 e 12 µM) por 48 e 24 horas, respectivamente. Em seguida, o meio foi removido e as células foram coradas com Hoechst 33342 (5 µg mL⁻¹, Invitrogen) e iodeto de propídio (1 µg mL⁻¹, Invitrogen) diluídos em PBS e incubadas a 37°C por 20 minutos na ausência de luz. As células foram examinadas utilizando um Microscópio de Fluorescência Confocal Zeiss LSM800 no Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal (FOAr/Unesp) sob supervisão da Dra. Paula Aboud Barbugli.

3.7.10 *Ensaio de apoptose com Anexina V*

A detecção de apoptose induzida pelos compostos **1** e **4** nas células MDA-MB-231 e MCF-10A foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit PE Annexin V Apoptosis

Detection (BD Biosciences). As células ($0,4 \times 10^5$ células por poço) foram semeadas em placas de 24 poços estéreis e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora. Em seguida, o meio foi removido e as células tratadas com os complexos **1** (5, 10 e 20 µM) e **4** (6 e 12 µM) por 48 horas. Camptotecina foi empregada como controle positivo de apoptose. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS e 200 µL de tampão de ligação do kit foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas com 2,5 µL de 7-amino-actinomicina D (7AAD) e 2,5 µL de Ficoeritrina (PE) Anexina V por 15 minutos na ausência de luz. E então, o sobrenadante foi removido e 300 µL de tampão de ligação foram adicionados a cada poço. As células foram removidas dos poços com auxílio de um scraper e transferidas para os tubos de citometria. As amostras foram analisadas no citômetro BD Accuri C6 e a fluorescência quantificada através do software CSampler. Os resultados são expressos como a porcentagem de apoptose total (soma das células em apoptose recente e apoptose tardia).

3.7.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0. A média e o desvio padrão foram calculados, e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet.

3.8 Ensaios de interação com o ctDNA

Os ensaios de interação com o ctDNA foram realizados em tampão Tris-HCl (Tris-HCl 5 mM e NaCl 50 mM, pH 7,4). As soluções estoque dos complexos de prata foram preparadas em DMSO e diluídas até as concentrações desejadas em tampão Tris-HCl, com concentração final de DMSO inferior a 3%.

Uma solução estoque de ctDNA (*calf thymus*) foi preparada a partir da adição de aproximadamente 5 mg de ctDNA (Sigma) em 2,5 mL de tampão Tris-HCl. A solução foi mantida na geladeira (6°C) por 48 horas para completa solubilização. E então, a concentração da solução de ctDNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-Vis, assumindo a absorvidade molar (ϵ) do ctDNA em 260 nm igual a $6600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$. A pureza das soluções de ctDNA foi verificada calculando a razão da absorbância em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), valores entre 1,8 e 1,9 indicam que o ctDNA estava suficientemente livre de proteínas.

3.8.1 Titulação espectroscópica

As titulações espectroscópicas foram realizadas registrando-se os espectros de UV-Vis dos compostos **1** e **4** na presença de quantidades crescentes de ct-DNA (0 – 60 µM), mantendo constante a concentração dos compostos de prata (20 µM).

Para esse experimento, foram utilizadas duas cubetas de quartzo: cubeta 1 (branco) contendo tampão Tris-HCl e DMSO, e cubeta 2 contendo tampão Tris-HCl e o complexo de prata em DMSO (2×10^{-5} mol L⁻¹). Foram adicionados 18 µL de uma solução de ctDNA (1×10^{-3} mol L⁻¹) a cada cubeta e o espectro de UV-Vis dos complexos registrado. Realizou-se sucessivas adições de ctDNA, de forma que as mudanças nos espectros foram consideradas decorrentes da interação entre o complexo e ctDNA. A constante intrínseca de ligação (K_b) foi obtida a partir da relação de Benesi-Hildebrand,

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \times \frac{1}{K_b [DNA]}$$

Onde A_0 e A são as absorvâncias dos compostos na ausência e na presença do DNA, respectivamente. E ε_G e ε_{H-G} são os coeficientes de absorvidade molar do composto na ausência e na presença do DNA, respectivamente. O valor de K_b foi calculado através da razão entre os coeficientes linear e angular do gráfico $\frac{A_0}{A - A_0}$ versus $\frac{1}{[DNA]}$.

3.8.2 Dicroísmo circular

Foram preparadas amostras de ctDNA (5×10^{-5} mol L⁻¹) em tampão Tris-HCl na presença de diferentes concentrações dos compostos de prata ($r = [\text{complexo}] / [\text{ctDNA}] = 0,05; 0,1; 0,2$ e $0,3$). As amostras foram preparadas no dia anterior da leitura e incubadas a 37°C por 18 horas. Os espectros de CD do ctDNA livre e das amostras contendo os complexos **1** e **4** foram registrados em um espectropolarímetro JASCO J-815. As leituras foram feitas na faixa de 235 a 300 nm a uma velocidade de 100 nm min⁻¹, com acúmulo de 4 scans e temperatura de 25°C.

3.8.3 Ensaios de competição com Hoechst 33258 e Tiazol Orange (TO)

Estudos de competição foram realizados com as sondas Hoechst 33258 e Tiazol Orange (TO). Soluções de ct-DNA (60 µM) pré-tratadas individualmente com TO (6 µM) e Hoechst 33258 (6 µM) foram preparadas em tampão Tris-HCl. Foram adicionadas alíquotas de uma

solução do composto de prata ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO) às soluções de TO-ctDNA e Hoechst-ctDNA. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 25°C e os espectros de emissão registrados. A concentração dos compostos **1** e **4** variou entre 6 e $60 \mu\text{M}$. Os espectros de emissão do TO-ctDNA foram registrados na faixa de 500 – 680 nm usando o comprimento de onda de excitação igual a 480 nm para TO. E os espectros de emissão do Hoechst-ctDNA foram registrados na faixa de 360 – 600 nm usando o comprimento de onda de excitação igual a 350 nm para o Hoechst 33258.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são sintetizadas de maneira relativamente simples, a partir da condensação equimolar de um aldeído ou cetona com uma tiossemicarbazida em meio alcoólico com quantidades catalíticas de ácido. A reação se inicia pela protonação do oxigênio da carbonila (ativação) para formar o intermediário íon oxônio seguido do adição nucleofílica do nitrogênio (N-1) da tiossemicarbazida, que perde uma molécula de água e, formando a tiossemicarbazona (TENÓRIO *et al.*, 2005) (Figura 13).

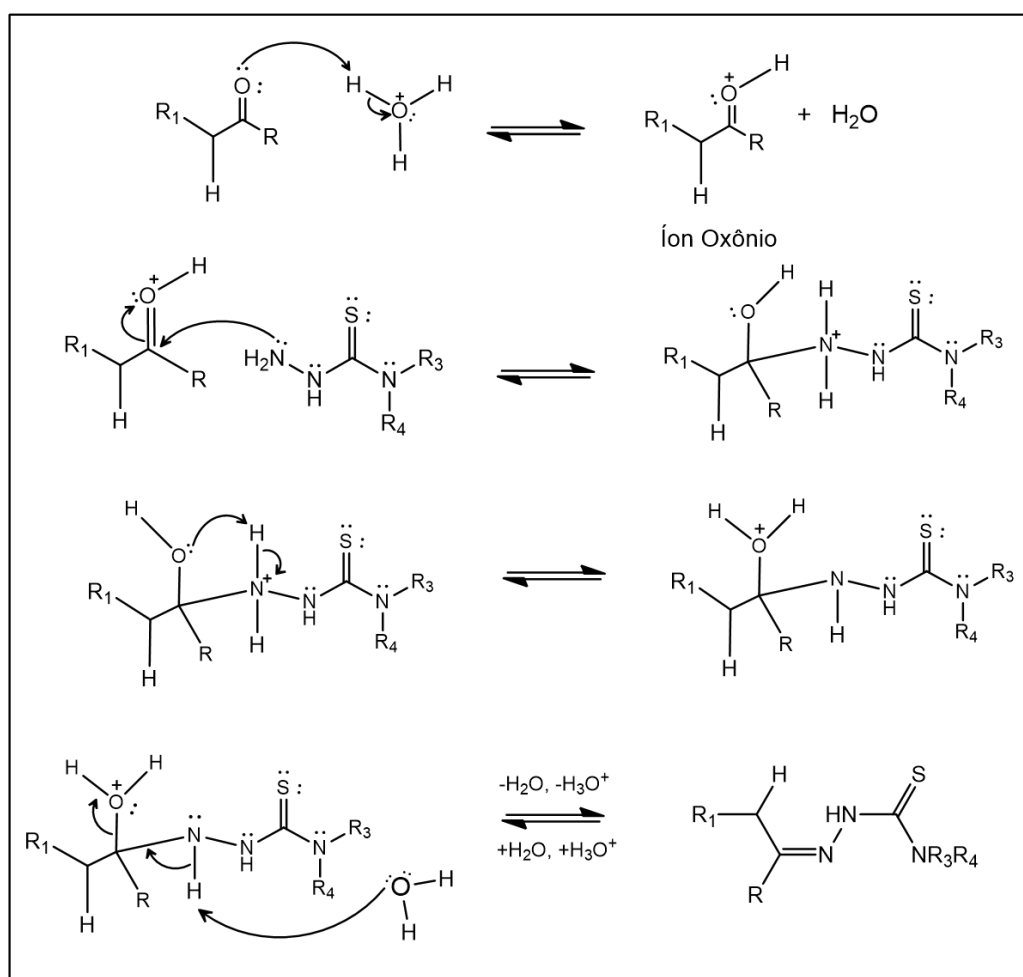


Figura 13 - Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

As tiossemicarbazonas utilizadas para a síntese dos novos complexos de prata (I) foram preparadas a partir de dois aldeídos: i) 2-piridinacarboxaldeído e ii) 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (vanilina).

Os ligantes derivados do 2-piridinacarboxaldeído foram preparados conforme descrito na literatura (LOBANA *et al.*, 2010). Os compostos 2-formilpiridina-*N*(4)-*R*-tiossemicarbazona {*R* = H (**L1**); Me (**L2**) e Et (**L3**)} (Figura 14) foram caracterizados por espectroscopia no IV e RMN de ^1H e ^{13}C . Esses resultados serão discutidos juntamente com os dados obtidos para os complexos de prata (I).

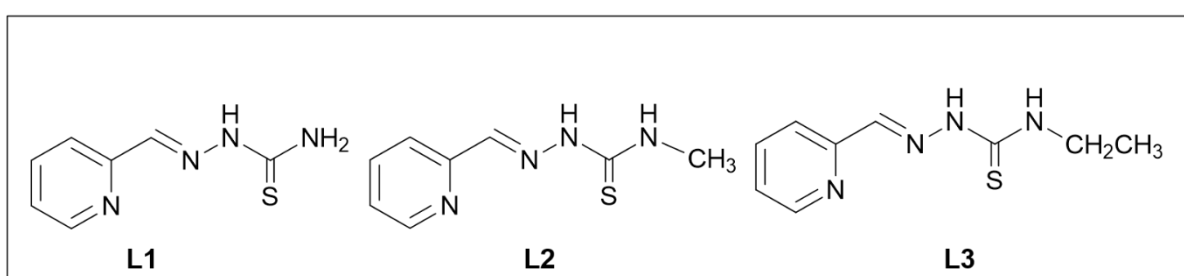
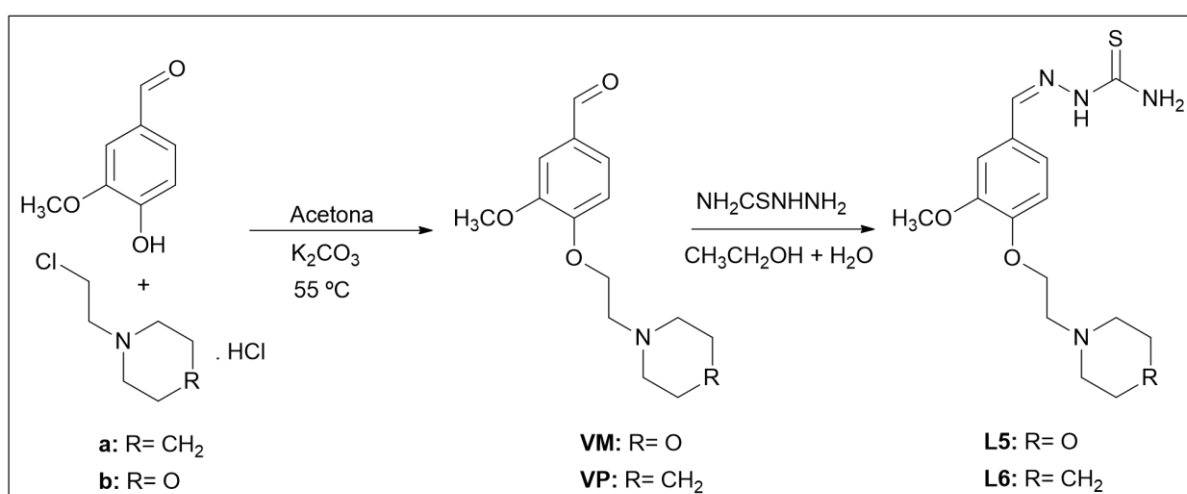


Figura 14 - Estrutura dos ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

O composto 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (**L4**) foi sintetizado conforme procedimento já descrito na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Os ligantes inéditos derivados do 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (vanilina) foram preparados em duas etapas: i) funcionalização do grupo fenol e ii) condensação do aldeído apropriado com a tiossemicarbazida, Esquema 2.



Esquema 2 - Síntese dos ligantes derivados do 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído. **Fonte:** Autor.

Na primeira etapa, os compostos **VM** (3-metoxi-4-[2-(morfolinil)etóxi] benzaldeído) e **VP** (3-metoxi-4-[2-(piperidinil)etóxi] benzaldeído) foram preparados a partir do tratamento do 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído com cloridrato de 1-(2-cloroetil) morfolina e cloridrato de 1-(2-cloroetil) piperidina, respectivamente (POURSHOJAEI *et al.*, 2019). Os espectros de RMN de ^1H evidenciaram a formação dos produtos **VM** e **VP** a partir do desaparecimento do sinal referente ao grupo fenol em 10,26 ppm (vanilina) e presença dos sinais referentes aos grupos 2-(morfolinil)etóxi e 2-(piperidinil)etóxi em campo blindado (5 – 1 ppm) (Figura 15). Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e do aldeído foram observados na região de 10 – 6 ppm confirmando a estrutura proposta para os compostos **VM** e **VP**. O esquema de numeração utilizado na atribuição dos sinais de hidrogênio é mostrado na Figura 16. Os dados dos espectros de RMN de ^1H são apresentados na Tabela 1.

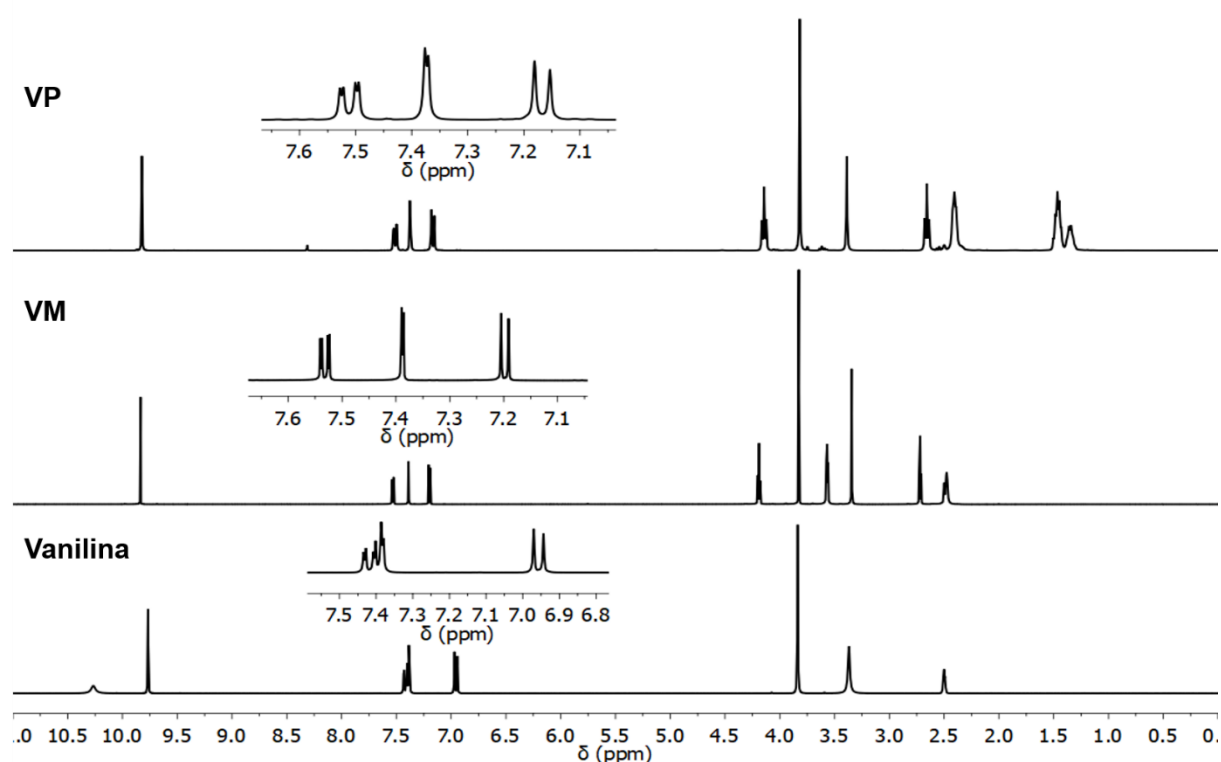


Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H dos compostos vanilina, **VM** e **VP** em solução de DMSO-d_6 .
Fonte: Autor.

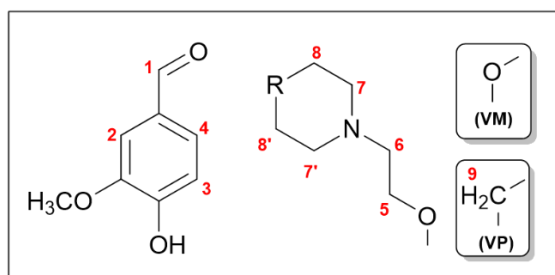


Figura 16 - Representação da numeração adotada para atribuição dos hidrogênios constituintes dos compostos vanilina, **VM** e **VP**. **Fonte:** Autor.

Tabela 1 - Dados dos espectros de RMN de ^1H dos compostos vanilina, **VM** e **VP** em DMSO-d_6 . Deslocamento químico (ppm), multiplicidade, integral (nH) e constante de acoplamento (J, Hz).

Atribuições	Vanilina	VM	VP
OH	10,26 (b, 1H)	-	-
H1	9,77 (s, 1H)	9,83 (s, 1H)	9,82 (s, 1H)
H2	7,38 (d, 1H) (J = 1,8)	7,39 (d, 1H) (J = 1,9)	7,37 (d, 1H) (J = 1,8)
H3	6,95 (d, 1H) (J = 7,9)	7,20 (d, 1H) (J = 8,2)	7,15 (d, 1H) (J = 8,2)
H4	7,41 (dd, 1H) (J = 7,9; 1,8)	7,53 (dd, 1H) (J = 8,2; 1,9)	7,50 (dd, 1H) (J = 8,2; 1,8)
H5	-	4,19 (t, 2H) (J = 6,0)	4,14 (t, 2H) (J = 6,0)
H6	-	2,72 (t, 2H) (J = 6,0)	2,66 (t, 2H) (J = 6,0)
H7	-	2,48 (b, 4H)	2,41 (b, 4H)
H8	-	3,57 (t, 4H) (J = 4,5)	1,47 (b, 4H)
H9	-	-	1,34 (b, 2H)
OCH ₃	3,83 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)	3,82 (s, 3H)

s = singlete; d = duplete; t = tripleto; dd= duplo dublete; b = sinal alargado.

Fonte: Autor.

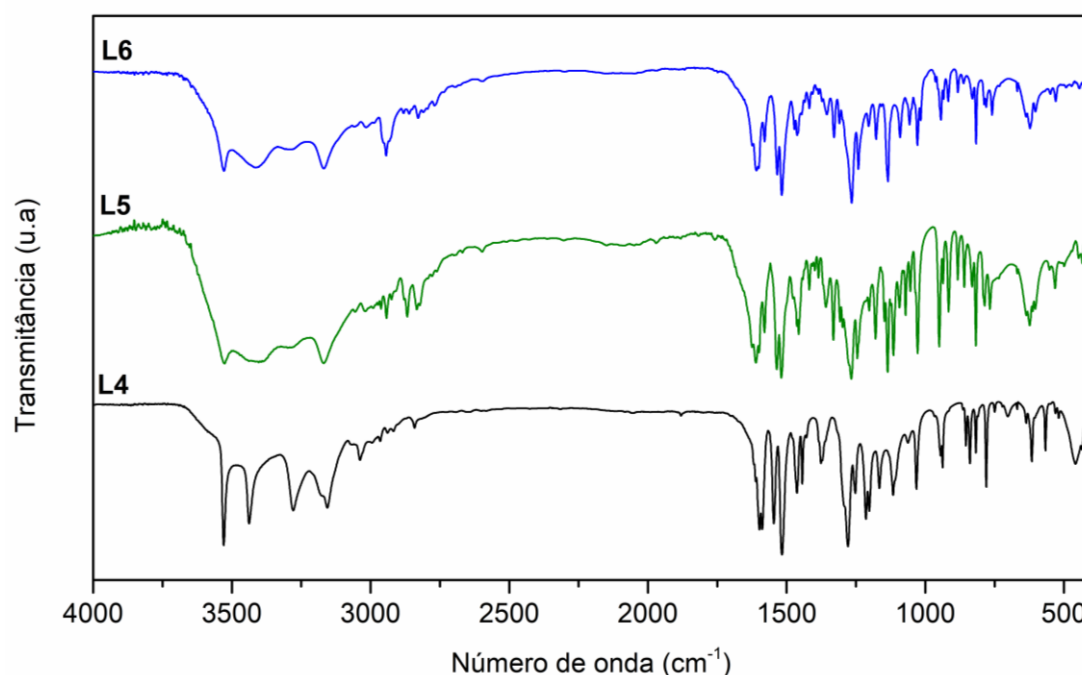
Na segunda etapa, os novos compostos **L5** e **L6** foram obtidos como sólidos microcristalinos com bom rendimento de síntese (70 – 80%). Os dados de análise elementar (Tabela 2) confirmaram a formulação proposta para os compostos **L5** e **L6**. Os resultados também indicaram a presença de três moléculas de água na composição. Além disso, os dados de microanálise demonstraram a pureza dos compostos **L5** e **L6**.

Tabela 2 - Rendimento, massa molar (g mol^{-1}) e dados de análise elemental (CHN) dos compostos **L5** e **L6**.

Compostos	Rend. (%)	MM	Análise elemental ^a		
			%C	%H	%N
L5 ·3H ₂ O	72	392,47	45,87 (45,90)	6,88 (7,19)	14,17 (14,28)
L6 ·3H ₂ O	83	390,49	49,05 (49,21)	7,77 (7,74)	14,14 (14,35)

^a valores calculados entre parênteses. **Fonte:** Autor.

As tiossemicarbazonas derivadas da vanilina **L4**, **L5** e **L6** foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros no IV (Figura 17) exibiram as absorções típicas de tiossemicarbazonas. As principais frequências observadas são: i) bandas de $\nu(\text{NH})$ em $3290 - 3278 \text{ cm}^{-1}$ referentes ao grupo tioamida ($-\text{NH}_2$); ii) bandas de $\nu(\text{NH})$ em $3170 - 3155 \text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao grupo hidrazínico ($=\text{N}-\text{NH}-$); iii) bandas de estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ em ca. 1590 cm^{-1} ; iv) bandas de estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ em 780 (**L4**), 766 (**L5**) e 758 cm^{-1} (**L6**).

**Figura 17** - Espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes derivados da vanilina em KBr.

Os compostos **L4**, **L5** e **L6** também foram caracterizados por espectroscopia de RMN. Os espectros de RMN de ^1H , DEPTQ, HSQC e HMBC foram adquiridos em DMSO- d_6 . O esquema de numeração utilizado na atribuição dos sinais é apresentado na Figura 18.

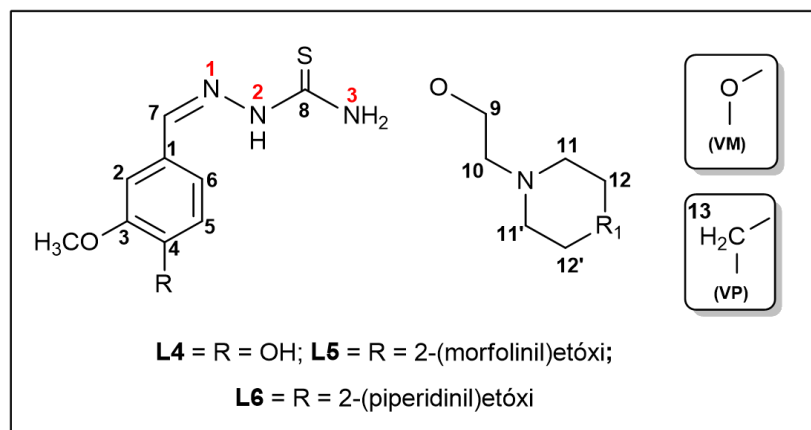


Figura 18 - Representação da numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes das tiossemicarbazonas derivadas da vanilina. **Fonte:** Autor.

A ausência do sinal do hidrogênio do aldeído em ca. 9,8 ppm dos precursores (**VM** e **VP**) e presença dos sinais típicos de tiossemicarbazonas nos espectros de RMN de ^1H confirmaram a formação dos compostos **L5** e **L6**. Todos os sinais e integrais de acordo com a estrutura molecular proposta foram observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 19, Apêndice 1). O hidrogênio hidrazínico (=N-NH-) foi observado como um singlete em 11,26 (**L4**) e 11,31 ppm (**L5** e **L6**). Os hidrogênios da tioamida (-NH₂) foram observados como dois singletos na região de 7,9 – 8,2 ppm. Um singlete em ca. 7,95 ppm foi atribuído ao hidrogênio imínico (HC=N). Os hidrogênios aromáticos da vanilina (H₂, H₅, H₆) foram observados na faixa de 6,7 – 7,6 ppm, e o sinal do grupo metóxi em ca. 3,8 ppm. A análise das correlações entre os sinais de hidrogênios registradas via espectro COSY (Apêndice 3 e 4) permitiram a atribuição dos sinais referentes aos grupos N-etilmorfolina/piperidina observados em campo blindado (5 – 1 ppm) nos espectros de **L5** e **L6**.

Todos os sinais de ^{13}C esperados foram observados nos espectros de DEPTQ (Figura 20, Apêndice 1), a atribuição foi realizada a partir da análise das correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C registradas via mapas de contorno HSQC e HMBC (Apêndice 2, 5 e 6). Os sinais do carbono da tioamida (CS) foram observados em 177,38 (**L4**), 177,53 (**L5**) e 177,51 ppm (**L6**).

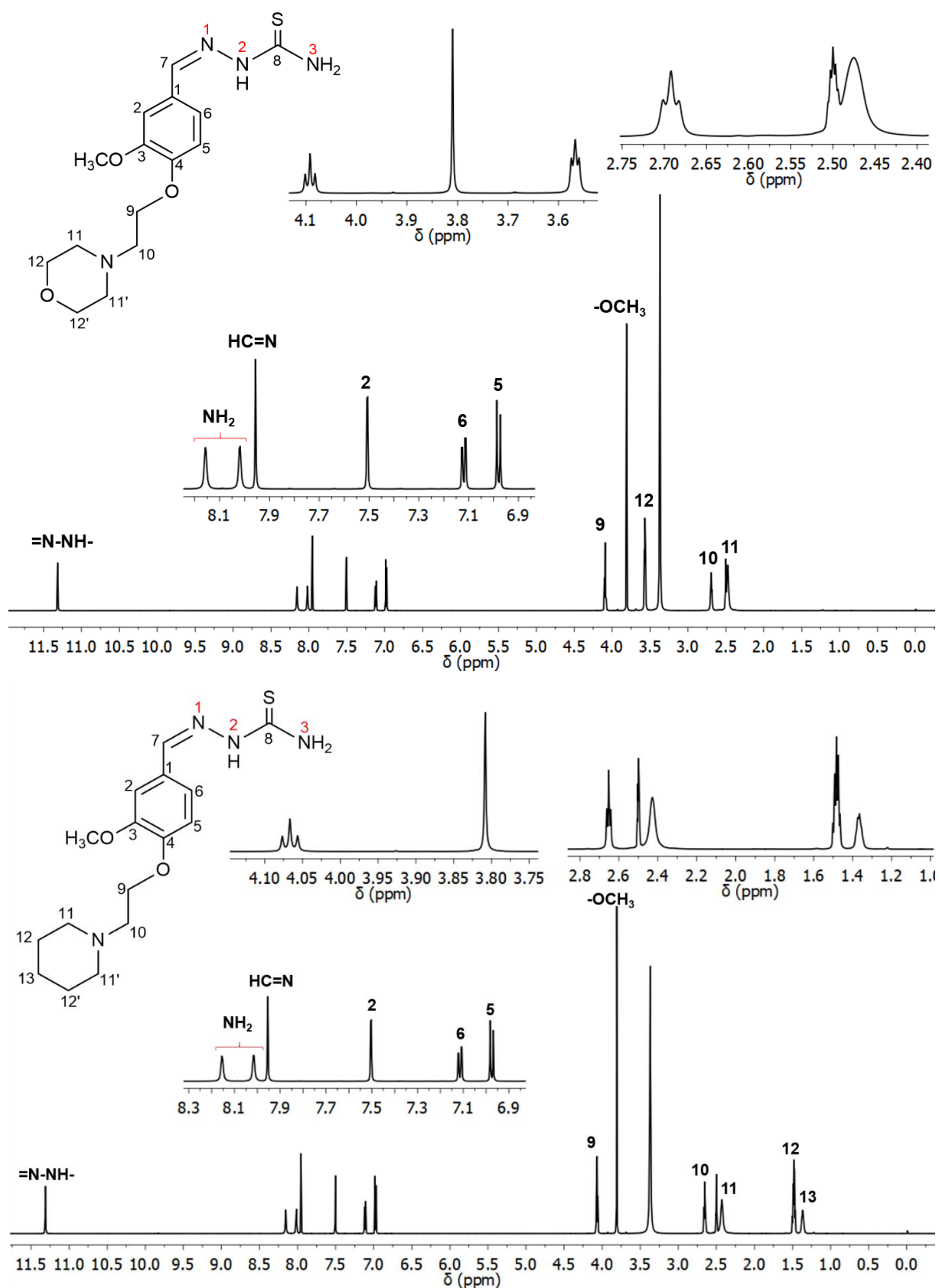


Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H dos ligantes L5 e L6 em solução de DMSO-d_6 . **Fonte:** Autor.

Os sinais em 142,97 (**L4**), 142,52 (**L5**) e 142,53 ppm (**L6**) foram atribuídos ao carbono azometínico (HC=N). Os sinais dos carbonos aromáticos foram observados na região de 108 – 150 ppm, e o carbono do grupo metóxi em ca. 55,8 ppm. Os sinais em campo blindado na faixa de 66 – 23 ppm nos espectros de **L5** e **L6** foram atribuídos aos carbonos referentes aos grupos N-etilmorfolina/piperidina.

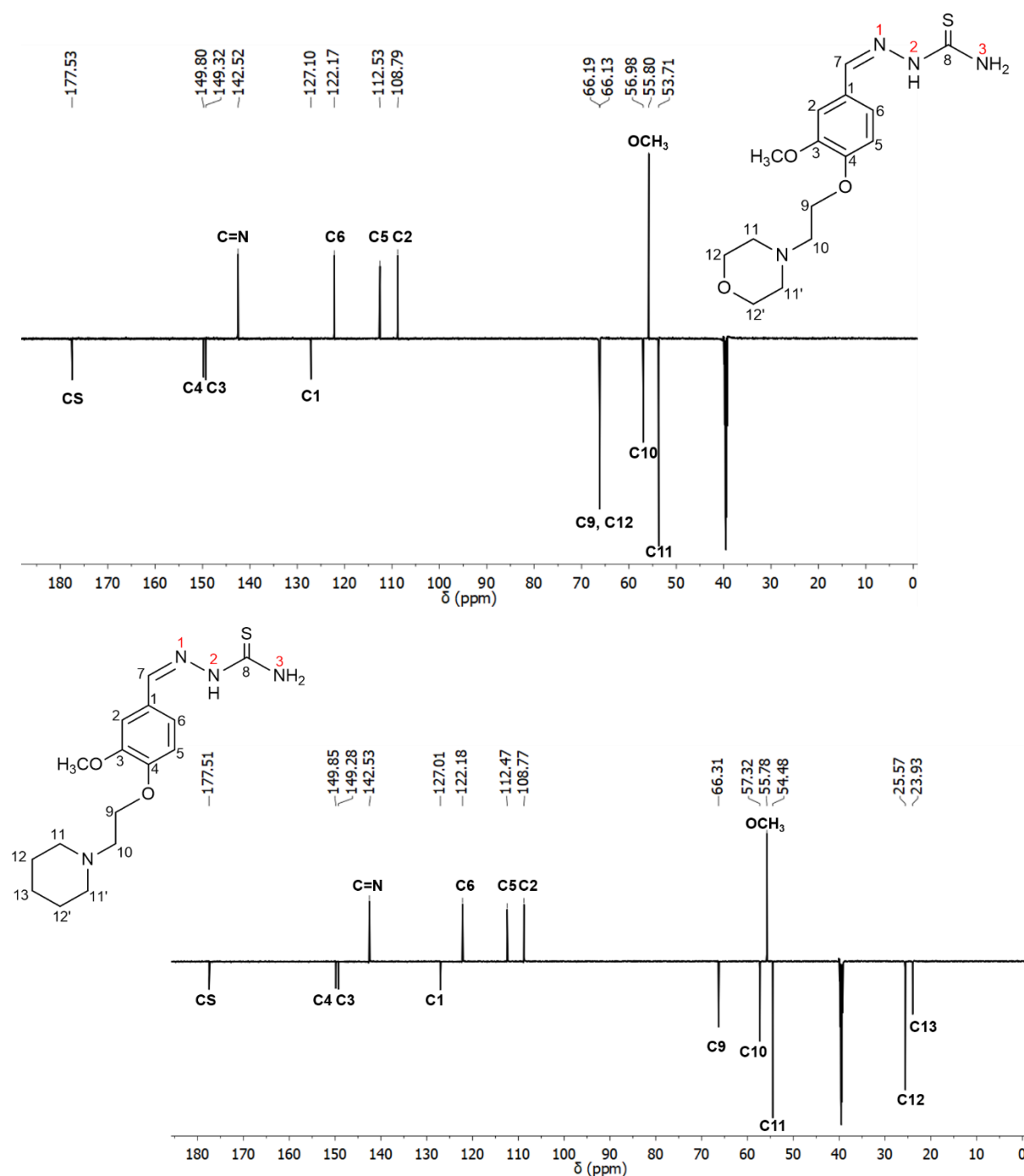


Figura 20 - Espectros de DEPTQ dos ligantes **L5** e **L6** em solução de DMSO- d_6 . **Fonte:** Autor.

4.2 Síntese dos complexos de prata (I)

4.2.1 Considerações iniciais sobre complexos de prata (I) e tiossemicarbazonas

A química de coordenação das tiossemicarbazonas foi inicialmente explorada em 1961. As tiossemicarbazonas são ligantes polidentados, que podem se coordenar via átomo de enxofre e/ou nitrogênio. Esses ligantes existem como tautômeros (Figura 21) tiona-tiol (**a** e **b**), e podem se ligar ao centro metálico por diferentes modos de coordenação na forma neutra (**a**) ou aniônica (**c**). Como ligantes neutros, as tiossemicarbazonas podem se coordenar de forma monodentada através do átomo de S (modos A e B), como também de forma N,S-bidentada (modos C e D). Além disso, se o substituinte em C₁ possuir um átomo doador, podem se ligar de modo tridentado (modos E – G), tais modos de coordenação são apresentados na Figura 22 (LOBANA et al., 2009a).

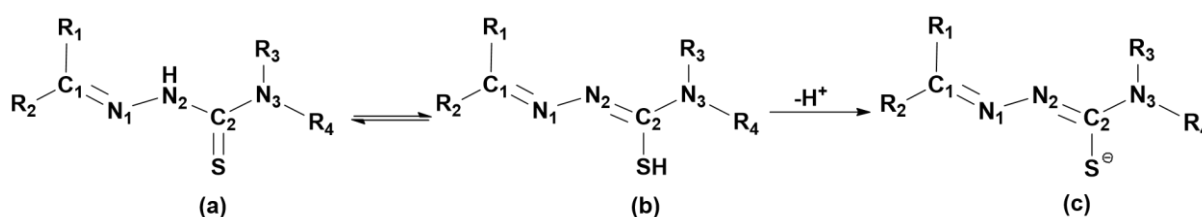


Figura 21 - Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

Apesar do grande número de complexos metálicos contendo tiossemicarbazonas na literatura, poucos trabalhos reportam a síntese de complexos de prata (I) com essa classe de ligantes. Os grupos de pesquisa de Lobana e Castiñeiras fizeram importantes contribuições na investigação dessa classe de compostos de prata (I) (CASTIÑEIRAS, 2008, 2009, 2012; LOBANA et al., 2008a, 2008b, 2009b). A maioria dos complexos de prata e tiossemicarbazonas contém ligantes fosfinas como ligantes secundários. Em geral, os complexos com fosfinas são monômeros ou dímeros, enquanto que as estruturas cristalinas dos complexos sem fosfinas mostram a formação de diferentes clusters como tetrâmeros e hexâmeros.

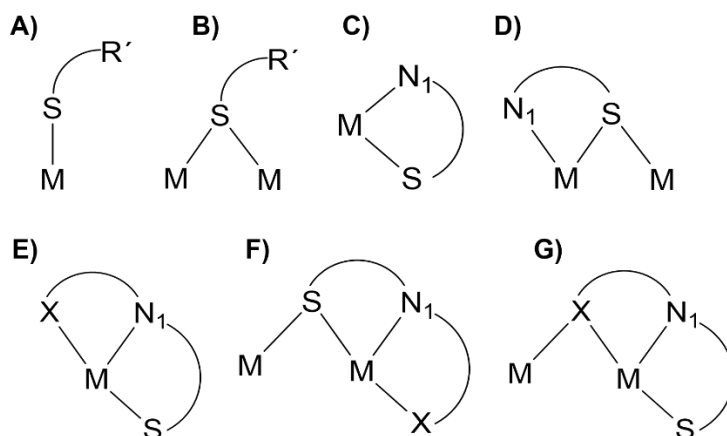


Figura 22 - Possíveis modos de coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

A estrutura cristalina do primeiro cluster de prata com tiossemicarbazonas foi determinada em 2004 por Ashfield *et al.* No composto $[\text{Ag}_6\text{L}_6]$ (L = 2-hidróxibenzadeíldo tiossemicarbazona), cada átomo de prata está coordenado a dois átomos de enxofre e a um átomo de nitrogênio da hidrazina, e cada átomo de enxofre faz ponte entre dois átomos de prata formando uma cavidade central do tipo Ag_6S_6 . Depois desse trabalho, outros complexos de prata (I) hexanucleares e tetranucleares foram sintetizados com diferentes ligantes tiossemicarbazonas N,S -bidentadas ou N,S,X -tridentadas (Figura 23), em geral, as tiossemicarbazonas estão coordenadas na forma neutra e/ou aniônica ao íon prata (I) (ONODERA, 2007; BERMEJO, 2008; CASTIÑEIRAS, 2008, 2009, 2012; PEDRIDO, 2009; QIAO, 2009; LI, 2010).

Lobana *et al.* sintetizaram vários complexos de prata (I) contendo tiossemicarbazonas e trifenilfosfina (PPh_3) (LOBANA et al., 2008a, 2008b, 2009b, 2012; LOBANA; SHARMA; BUTCHER, 2009). Em geral, os compostos de prata (I) são monômeros e dímeros, as tiossemicarbazonas na forma neutra se ligam a prata (I) via diferentes modos de coordenação. As estruturas cristalinas dos compostos revelaram a coordenação monodentada via átomo de enxofre do ligante tiossemicarbazona ao íon prata (I) em monômeros do tipo $[\text{AgCl}(\eta^1\text{-S-L})(\text{PPh}_3)_2]$, dímeros com átomo de enxofre em ponte $[\text{Ag}_2\text{X}_2(\mu\text{-S-L})_2(\text{PPh}_3)_2]$ e dímeros com halogênio em ponte $[\text{Ag}_2(\mu\text{-X})_2(\eta^1\text{-S-L})_2(\text{PPh}_3)_2]$ ($\text{X} = \text{Cl}; \text{Br}$). Como também a coordenação N,S -bidentada dos ligantes tiossemicarbazonas em compostos do tipo $[\text{Ag}(N,S\text{-L})(\text{PPh}_3)_2]\text{X}$ ($\text{X} = \text{NO}_3; \text{CH}_3\text{COO}$), os principais modos de coordenação das tiossemicarbazonas a prata (I) são apresentados na Figura 24.

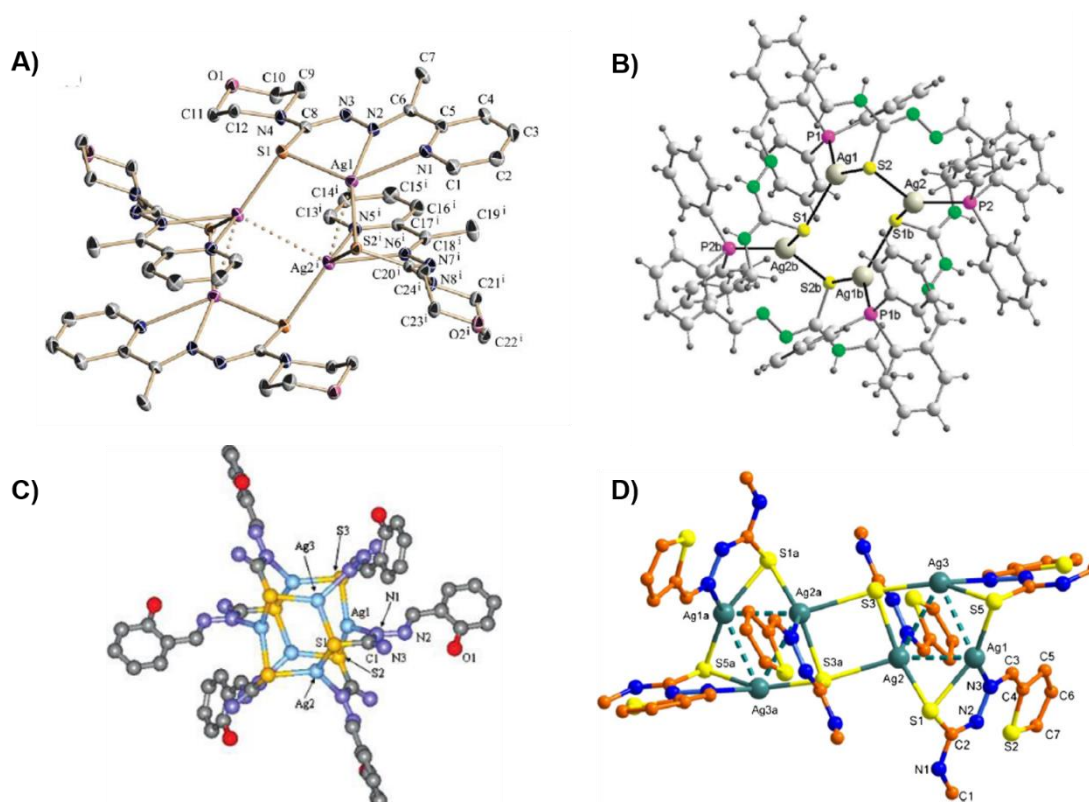


Figura 23 - Clusters de prata (I) com tiossemicarbazonas sintetizados por (A) Onodera, (B) Castiñeiras, (C) Ashfield e (D) Li. **Fonte:** Adaptado de ASHFIELD, 2004; ONODERA, 2007; CASTINEIRAS, 2009; LI, 2010.

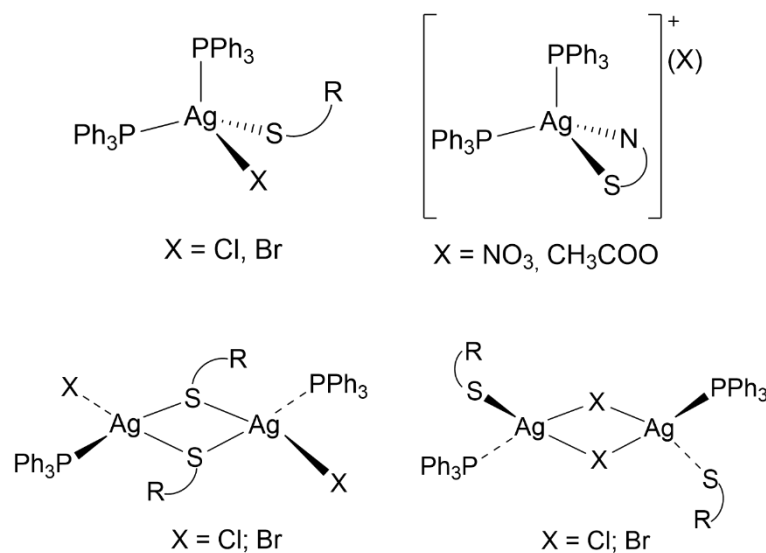
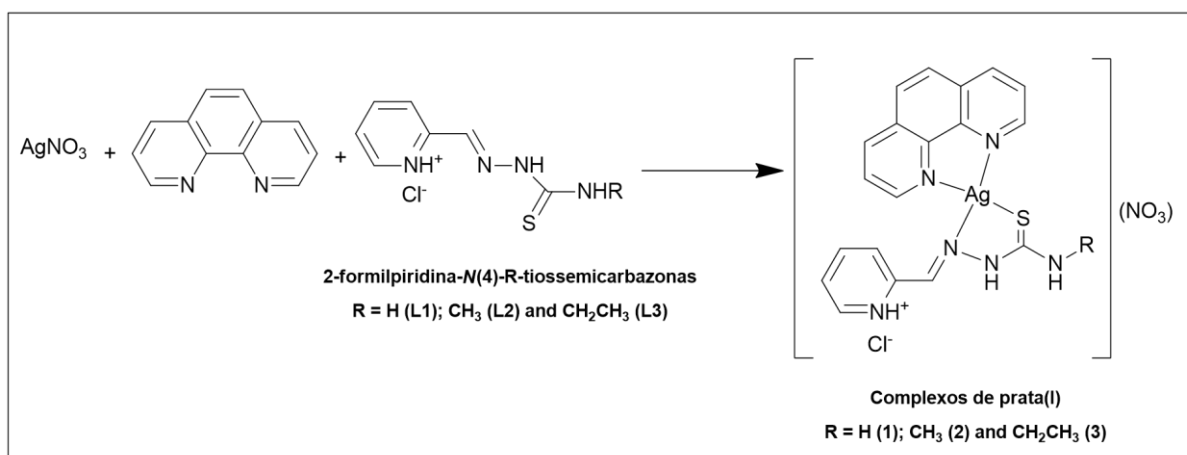


Figura 24 - Complexos de prata (I) com tiossemicarbazonas e trifenilfosfina sintetizados por Lobana *et al.* **Fonte:** Autor.

4.2.2 Síntese e caracterização dos complexos do tipo $[Ag(phen)(L1-L3)](NO_3)$

Os novos complexos de prata $[Ag(phen)(L1-L3)](NO_3)$ foram planejados a partir do composto protótipo $[Ag(phen)(tu)]X$ (phen = 1,10-fenantrolina; tu = tiouréia; $X = NO_3^-$, $CF_3SO_3^-$) anteriormente sintetizado por SEGURA *et al.* (2014). O ligante tiouréia foi substituído por 2-formilpiridina tiossemicarbazonas.

Os compostos **1–3** foram sintetizados reagindo $AgNO_3$, 1,10-fenantrolina (phen) e 2-formilpiridina-*N*(4)-*R*-tiossemicarbazona {*R* = H (**L1**); Me (**L2**) e Et (**L3**)} na razão molar 1:1:1, respectivamente (Esquema 3).



Esquema 3 - Síntese dos complexos derivados da 1,10-fenantrolina. **Fonte:** Autor.

A coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas de modo *N,S*-bidentado pode diminuir a cinética das reações de troca de ligantes em meio biológico. Tal modo de coordenação desses ligantes a prata (I) já foi observado por Lobana *et al* (2008a, 2008b) em compostos do tipo $[Ag(L)(PPh_3)_2](NO_3)$ (*L* = acetona tiossemicarbazona) e $[Ag_2(L)_2(PPh_3)_2](NO_3)_2$ (*L* = furan-2-carbaldeído tiossemicarbazona), o qual pode ser explicado pela tendência do contra-íon NO_3^- ser pouco coordenante ao íon Ag^I . Logo, os novos complexos foram preparados a partir do sal de prata $AgNO_3$.

A reação entre o nitrato de prata e o ligante phen leva a formação imediata de um precipitado amarelo claro. O ligante phen coordena-se de modo *N,N*-quelante ao íon Ag^I , formando um complexo estável como já reportado na literatura (CREAVEN, 2005; ASLAM, 2016). Os compostos **1–3** foram preparados reagindo o complexo prata (I)-phen com os ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas. Os complexos são sólidos estáveis, possuem cor amarelo

escuro, são solúveis em solventes orgânicos como metanol, dimetilsufóxido e dimetilformamida, e insolúveis em água, acetonitrila, etanol e acetona.

Os dados de análise elementar (Tabela 3) confirmaram a relação estequiométrica esperada 1:1:1 (Ag: phen: L) para os compostos **1–3**. Além disso, os resultados indicaram que os complexos foram isolados como sais cloridrato, os compostos **1** e **3** apresentaram duas moléculas de água e **2** uma molécula de metanol na composição.

As medidas de condutividade molar dos complexos **1–3** foram realizadas em DMF a 298 K. Foram obtidos valores na faixa de 55–62 ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$), indicando que os compostos se comportam como eletrólitos 1:1 em soluções de DMF (GEARY, 1971).

Tabela 3 - Rendimento, massa molar (g mol^{-1}), condutividade molar ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$), e dados de análise elementar (CHN) dos complexos **1–3**.

Compostos	Rend. (%)	MM	Λ_M (DMF)	Análise elementar ^a		
				%C	%H	%N
[Ag(phen)(L1)](NO ₃)·HCl·2H ₂ O (1)	85	602,80	60,5	37,31 (37,86)	3,27 (3,51)	16,16 (16,27)
[Ag(phen)(L2)](NO ₃)·HCl·CH ₃ OH (2)	36	612,83	62,9	41,12 (41,16)	3,74 (3,78)	15,37 (16,00)
[Ag(phen)(L3)](NO ₃)·HCl·2H ₂ O (3)	61	630,85	55,0	39,64 (39,98)	3,85 (3,99)	14,83 (15,54)

^a valores calculados entre parênteses. **Fonte:** Autor.

As tiossemicarbazonas apresentam absorções típicas no IV que fornecem importantes informações sobre o modo de coordenação desses ligantes ao centro metálico (LOBANA *et al.*, 2009a). Devido a deslocalização eletrônica, as tiossemicarbazonas podem coexistir em equilíbrio tautomérico (Figura 25).

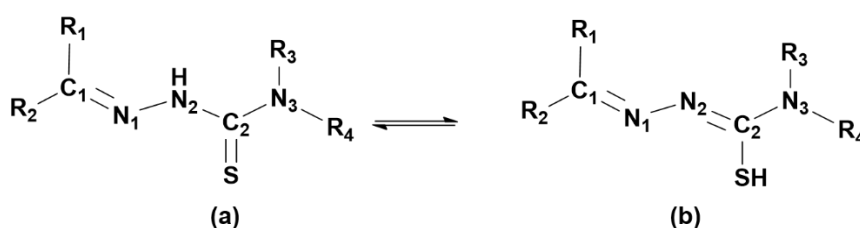


Figura 25 - Equilíbrio tautomérico tiossemicarbazonas. **Fonte:** Autor.

Se a coordenação ocorre via átomo de enxofre, as contribuições da forma tiol (**b**) aumentam, provocando um enfraquecimento da ligação C=S e produzindo um caráter parcial

de ligação C=N ao nitrogênio da tioamida. Logo, um deslocamento da banda de $\nu(\text{C}=\text{S})$ para menores frequências é observado nos espectros no IV dos complexos.

Como ligantes neutros, as tiossemicarbazonas exibem bandas de $\nu(\text{NH})$ em duas regiões: i) $3490 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ referente ao grupo tioamida e ii) $3160 - 3120 \text{ cm}^{-1}$ associada ao hidrogênio hidrazínico. No entanto, a coordenação das tiossemicarbazonas na forma aniônica resulta no desaparecimento do $\nu(\text{NH})$ do grupo hidrazínico. Além disso, a coordenação via nitrogênio imínico resulta no enfraquecimento da ligação C=N, o que é evidenciado pelo deslocamento das bandas de $\nu(\text{C}=\text{N})$.

Os compostos **1–3** e ligantes L1-L3 foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros no IV de **1–3** são apresentados na Figura 26. As principais frequências vibracionais (Tabela 4) foram atribuídas fazendo uma análise comparativa com os ligantes livres (tiossemicarbazonas e 1,10- fenantrolina).

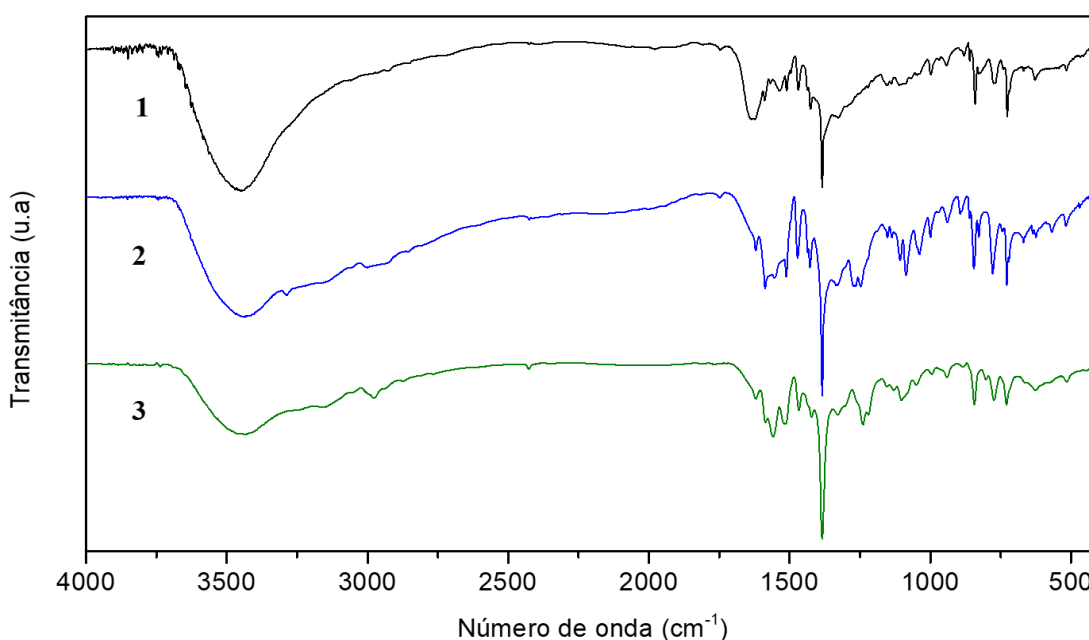


Figura 26 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **1–3** em KBr. **Fonte:** Autor.

As principais frequências observadas nos espectros das tiossemicarbazonas livres (Apêndice 7) são: i) bandas de $\nu(\text{NH})$ em $3435 - 3283 \text{ cm}^{-1}$ referentes ao grupo tioamida ($-\text{N}^4\text{HR}$); ii) bandas de $\nu(\text{NH})$ em $3161 - 3125 \text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao grupo hidrazínico ($-\text{N}^3\text{H}-$); iii) combinação dos modos vibracionais $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C}=\text{N})$ em 1585 cm^{-1} ; iv) bandas de estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ em 876 cm^{-1} (**L1** e **L3**) e 884 cm^{-1} (**L2**).

Os espectros no IV dos complexos **1–3** evidenciaram a coordenação dos ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas devido à presença das absorções em 1540–1590 cm^{-1} atribuídas à combinação dos modos vibracionais $\nu(\text{C}=\text{N}) + \delta(\text{NH})$. Além disso, a coordenação via átomo de enxofre das tiossemicarbazonas foi apontada pelo deslocamento do estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ de 884 – 876 cm^{-1} (ligantes livres) para 860 cm^{-1} nos complexos, como resultado do enfraquecimento da ligação CS. Também foi observada uma banda larga de $\nu(\text{OH})$ na região de 3400 cm^{-1} confirmando a presença de água de hidratação na estrutura dos compostos. Logo, não foi possível atribuir as bandas $\nu(\text{NH})$ e inferir sobre a forma que as tiossemicarbazonas estão coordenadas ao íon Ag^{I} , aniônica ou neutra.

A coordenação do ligante phen ao íon Ag^{I} foi evidenciada pelo deslocamento da banda de deformação CH fora do plano em 739 cm^{-1} (ligante livre) para menores frequências em **1–3** (726 cm^{-1}) (MUJAHID *et al.*, 2016). Os espectros no IV de **1–3** exibiram a absorção característica para o grupo iônico NO_3^- , uma banda intensa em 1384 cm^{-1} (NAKAMOTO K, 1978).

Tabela 4 - Atribuição das principais frequências vibracionais presentes nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e complexos **1–3**.

Compostos	$\nu(-\text{N}^4\text{HR})$	$\nu(-\text{N}^3\text{H}-)$	$\nu(\text{C}=\text{N}) + \delta(\text{NH})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\nu(\text{NO}_3)$	$\gamma(\text{CH})_{\text{ar}}$
L1	3435	3161	1585	876	-	-
L2	3286	3134	1585	884	-	-
L3	3284	3135	1585	876	-	-
Phen	-	-	-	-	-	739
1	-	-	1590	860	1384	726
2	-	-	1555	860	1384	726
3	-	-	1540	860	1384	726

ν = estiramento; δ = deformação angular no plano; γ = deformação fora do plano. **Fonte:** Autor.

Portanto, os dados espectroscópicos na região do infravermelho mostram a coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas e 1,10-fenantrolina ao íon Ag^{I} , e também a presença do contra-íon NO_3^- . Porém, o modo de coordenação desses ligantes nos complexos **1–3** foi investigado por RMN.

A espectroscopia de RMN foi empregada para investigar a estrutura dos compostos **1–3** e ligantes **L1–L3** em solução. Os espectros de RMN de ^1H , DEPTQ, HSQC e HMBC foram

adquiridos em DMSO- d_6 . O esquema de numeração utilizado na atribuição dos sinais é apresentado na Figura 27.

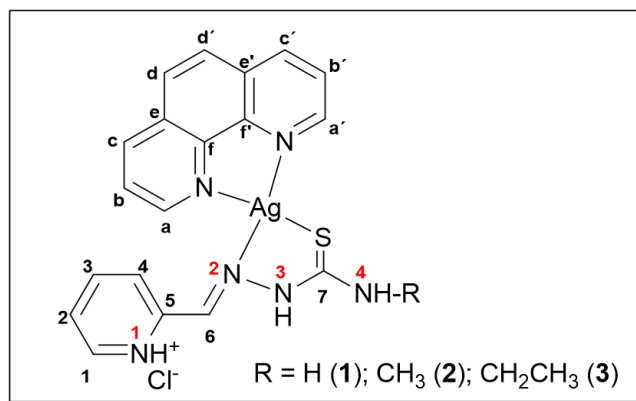


Figura 27 - Representação da numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes dos compostos 4–6. **Fonte:** Autor.

Os espectros de RMN de ^1H dos ligantes **L1–L3** (Apêndice 8) exibiram todos os sinais esperados. O sinal correspondente ao hidrogênio hidrazínico ($-\text{N}^3\text{H}-$) foi observado como um singlete em 11,80 ppm (L1), 11,70 ppm (L2) e 11,75 ppm (L3). Dois tripletos e dois dupletos foram observados entre 8,6 e 7,5 ppm, os quais foram atribuídos aos hidrogênios do anel piridínico. O sinal do hidrogênio imínico foi observado como um singlete em ca. 8,1 ppm. Os singletos largos em 8,29 e 8,46 ppm foram atribuídos ao $-\text{N}^4\text{H}_2$ terminal em L1. Para L2 e L3, os sinais do hidrogênio do grupo tioamida ($-\text{N}^4\text{HR}$) foram observados em 8,68 e 8,84 ppm, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H dos compostos 1–3 (Figura 28, Apêndice 9) exibiram apenas um conjunto de sinais para 1,10-fenantrolina e tiossemicarbazonas coordenadas, indicando a existência de uma única espécie em solução. A integração da área dos sinais mostrou que a razão entre phen: L é 1:1, o que justifica a proposta de complexos tetracoordenados do tipo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L})]^+$ em solução. Além disso, é importante destacar a ausência de sinais referentes aos ligantes livres (phen ou L1–L3) em todos os espectros.

A coordenação das tiossemicarbazonas como ligantes neutros em 1–3 foi evidenciada pela presença do sinal do hidrogênio hidrazínico ($-\text{N}^3\text{H}-$) em 12,34 ppm (1), 12,09 ppm (2) e 11,99 ppm (3) (LOBANA *et al.*, 2009a). Foi observado um deslocamento do sinal ($-\text{N}^3\text{H}-$) de ca. 0,2 – 0,6 ppm para região de menor blindagem. Após a coordenação, também ocorre o deslocamento dos sinais do hidrogênio da tioamida ($-\text{N}^4\text{HR}$) para região de menor blindagem. Esses deslocamentos são evidências da coordenação via átomo de enxofre a prata (I) que causa

a desblindagem desses átomos de hidrogênio. Além disso, não foram observadas mudanças nos sinais dos hidrogênios da piridina (7,4 – 8,7 ppm) após a complexação, sugerindo que o nitrogênio piridínico (N^1) não está coordenado ao íon Ag^I .

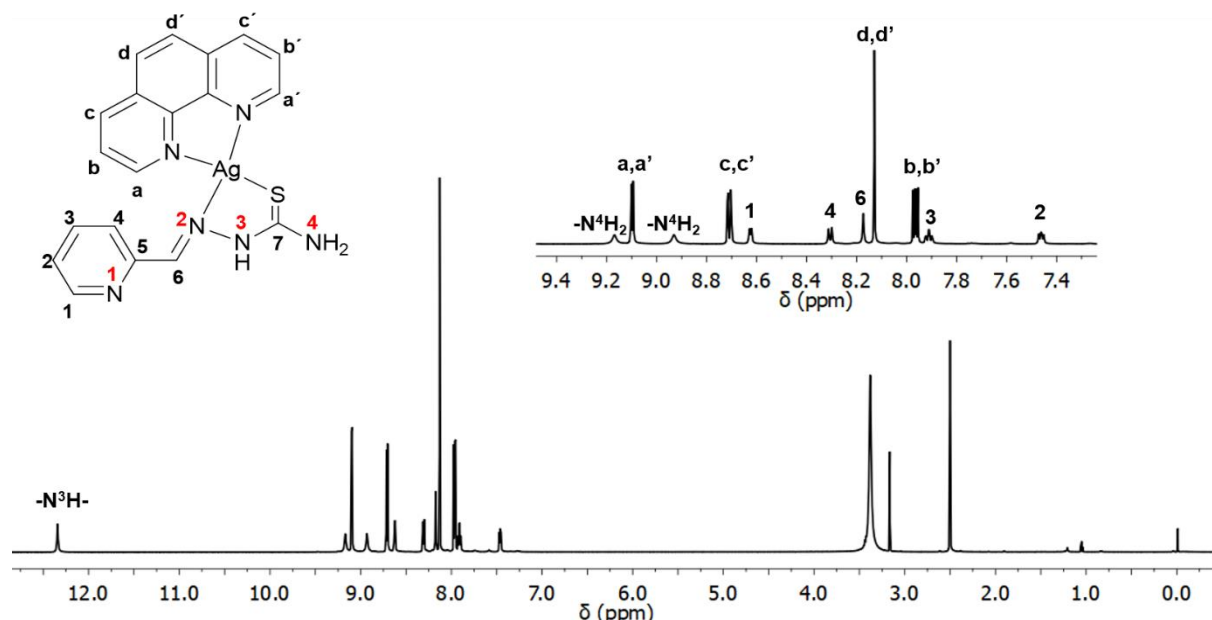


Figura 28 - Espectro de RMN de 1H do complexo **1** em solução de DMSO- d_6 . **Fonte:** Autor.

Sinais característicos de phen coordenada foram observados nos espectros de RMN de 1H de todos os complexos. Um conjunto de quatro sinais foi observado na região de 7,9 – 9,1 ppm, o que demonstra que o ligante phen encontra-se em um ambiente químico simétrico de coordenação a prata (I). Por exemplo, para o complexo **1** foram observados dois duplos dubletos em 8,70 e 9,10 ppm atribuídos aos hidrogênios Hc e Ha, respectivamente. Um singlete em 8,13 ppm atribuído a Hd e um multiplete em 7,97 ppm referente ao Hb. Após a complexação, um deslocamento dos sinais da phen para região de menor blindagem em comparação com os sinais correspondentes na phen livre (δ 7,79; 8,00; 8,50 e 9,11 ppm) é observado nos espectros de **1–3**. Tais mudanças estão de acordo com outros compostos de prata (I) contendo phen coordenada *N,N*-bidentada (MUJAHID, 2016; THORNTON, 2016). Os dados dos espectros de RMN de 1H são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **1–3** e ligantes livres (1,10-fenantrolina, L1-L3) em DMSO- d_6 . Deslocamento químico (ppm), multiplicidade, integral (nH) e constante de acoplamento (J, Hz).

Atribuição	L1	(1)	L2	(2)	L3	(3)	phen
-N ³ H-	11,80 (s, 1H)	12,34 (s, 1H)	11,70 (s, 1H)	12,09 (b, 1H)	11,75 (s, 1H)	11,99 (b, 1H)	-
-N ⁴ HR	8,46 e 8,93 (b, 1H)	9,17 e 8,93 (b, 1H)	8,68 (s, 1H)	9,18 (b, 1H)	8,84 (s, 1H)	9,15 (b, 1H)	-
Ha,a'	-	9,10 (dd, 2H) (J = 1,6; 4,5)	-	9,13 (dd, 2H) (J = 1,6; 4,5)	-	9,15 (b, 2H)	9,10 (dd, 2H) (J = 1,8; 4,3)
Hc,c'	-	8,70 (dd, 2H) (J = 1,6; 8,1)	-	8,75 (dd, 2H) (J = 1,6; 8,1)	-	8,79 (b, 2H)	8,50 (dd, 2H) (J = 1,8; 8,1)
H1	8,61 (d, 1H) (J = 4,8)	8,62 (d, 1H) (J = 4,6)	8,55 (d, 1H) (J = 4,8)	8,59 (b, 1H)	8,59 (d, 1H) (J = 5,0)	8,57 (b, 1H)	-
H4	8,32 (b, 1H)	8,30 (d, 1H) (J = 8,0)	8,26 (d, 1H) (J = 8,0)	8,27 (b, 1H)	8,28 (d, 1H) (J = 8,0)	8,24 (b, 1H)	-
Hd,d'	-	8,13 (s, 2H)	-	8,18 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	8,00 (s, 2H)
H6	8,09 (s, 1H)	8,17 (b, 1H)	8,08 (s, 1H)	8,10 (b, 1H)	8,09 (s, 1H)	8,11 (b, 1H)	-
Hb,b'	-	7,97 (m, 2H)	-	8,01 (m, 2H)	-	8,03 (m, 2H)	7,79 (m, 2H)
H3	7,99 (t, 1H) (J = 7,7)	7,91 (t, 1H) (J = 8,0)	7,84 (t; 1H) (J = 8,0)	7,89 (b, 1H)	7,95 (t; 1H) (J = 7,8)	7,91 (b, 1H)	-
H2	7,50 (t, 1H) (J = 7,7)	7,46 (b, 1H)	7,38 (t; 1H) (J = 4,8)	7,43 (b, 1H)	7,46 (b, 1H)	7,44 (b, 1H)	-
-CH ₃	-	-	3,01 (d, 3H) (J = 4,6)	3,15 (b, 3H)	-	-	-
-CH ₂ CH ₃	-	-	-	-	1,16 (t, 3H) (J = 7,0) 3,60 (b, 2H)	1,16 (t, 3H) (J = 7,0) 3,66 (b, 2H)	-

s = singletto; d = dupletto; t = tripletto; m = multipletto; dd = duplo dubletto; b = sinal alargado. **Fonte:** Autor.

O espectro de DEPTQ do complexo **1** (Figura 29) exibiu todos os sinais esperados, e a análise das correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C registradas via mapas de contorno HSQC e HMBC (Apêndice 10) auxiliaram na atribuição desses sinais. Os carbonos da tioamida (CS) e azometínico (HC=N) foram observados em 174,35 e 146,83 ppm, respectivamente. Os sinais dos carbonos da piridina foram observados na região de 120 – 153 ppm. Seis sinais referentes ao ligante phen foram observados entre 124 e 152 ppm, o deslocamento desses sinais evidenciou a coordenação *N,N*-bidentada da phen como observado em outros complexos da literatura (ASLAM *et al.*, 2016).

Os espectros de DEPTQ e mapas de contorno HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C também foram adquiridos para os compostos **2** e **3** (Apêndice 11–13). As principais evidências da coordenação *N,S*-bidentada das tiossemicarbazonas são deslocamentos dos sinais CS e HC=N (Tabela 6). Os sinais do carbono da tioamida (CS) foram observados em 175,18 (**2**) e 174,10 ppm (**3**), a partir das correlações com os sinais de hidrogênio em 3,15 (**2**) e 3,66 (**3**) dos substituintes R no átomo N(4) {R= Me (**2**), Et (**3**)}. E os sinais em 145,85 (**2**) e 145,07 (**3**) ppm foram atribuídos ao carbono azometínico (HC=N), a partir das correlações com sinal de H6.

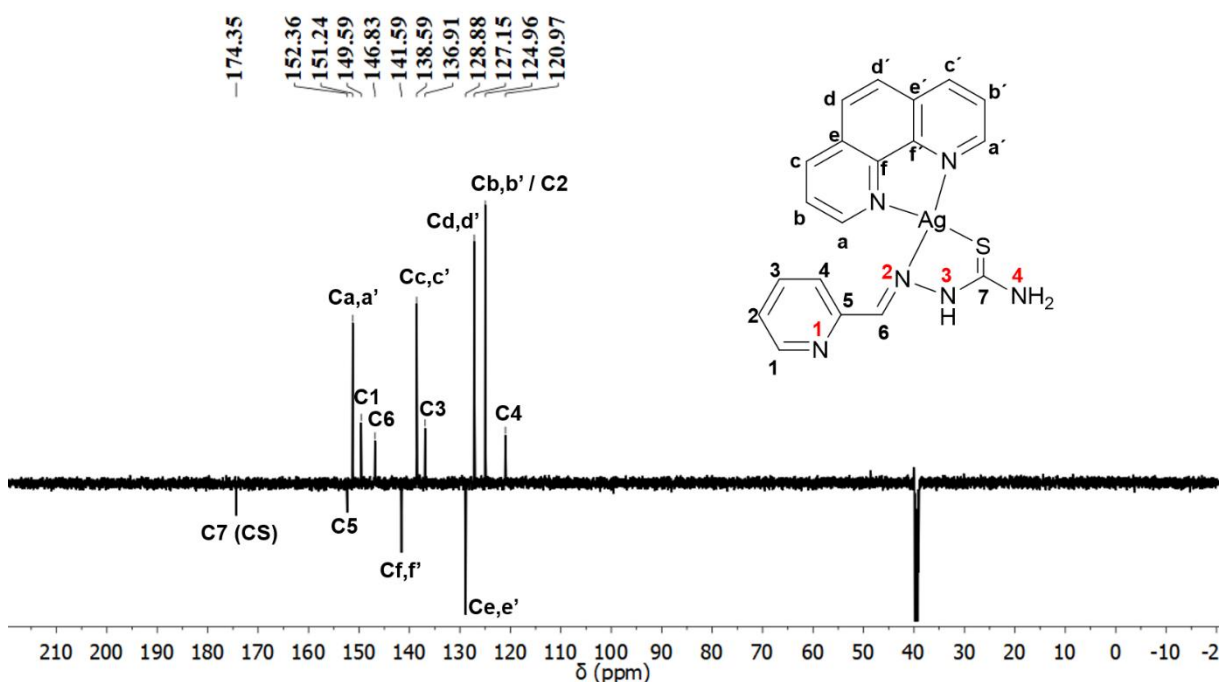


Figura 29 - Espectro de DEPTQ do complexo **1** em solução de DMSO- d_6 . **Fonte:** Autor.

Após a complexação, o sinal CS foi deslocado em ca. 2 – 4 ppm para região de maior blindagem, evidenciando uma diminuição do caráter π da ligação C=S como resultado da formação da ligação Ag-S (SEGURA *et al.*, 2014). Além disso, o sinal do carbono azometínico

(HC=N) foi deslocado para região de menor blindagem, indicando a coordenação do nitrogênio da imina ao íon prata (I).

Tabela 6 - Atribuição dos principais sinais de ^{13}C dos ligantes tiossemicarbazonas e complexos **1–3**. (δ (ppm), DMSO- d_6). **Fonte:** Autor.

Atribuição	L1	1	L2	2	L3	3
CS	178,53	174,35	177,96	175,18	176,89	174,10
CH=N	139,67	146,83	141,96	145,85	139,94	145,07

Experimentos de correlações heteronucleares ^1H - ^{15}N registrados via mapas de contorno HSQC e HMBC (Apêndice 14) foram realizados para o complexo **1**, a fim de obter informações sobre a coordenação dos átomos de nitrogênio dos ligantes tiossemicarbazonas e phen a prata (I).

Os nitrogênios hidrazínico (N^3) e da tioamida (N^4) foram observados em 172,14 e 117,2 ppm no mapa de contorno HSQC ^1H - ^{15}N , respectivamente. No mapa de contorno HMBC ^1H - ^{15}N foi observado o nitrogênio da piridina N^1 em 324,26 ppm com correlação com o hidrogênio azometínico (H6), enquanto que o sinal em 315,41 ppm foi atribuído ao átomo N^2 devido à sua correlação com o átomo H1. Ao comparar os sinais de ^{15}N de **1** com aqueles observados para 2-formilpiridina tiossemicarbazona livre {341,5 ($\text{N}^2=\text{C}$); 171,9 (N^3H); 110,2 (N^4H_2) e 329,1 ppm (N^1)} (VENKATACHALAM; PIERENS; REUTENS, 2014) foi observado um deslocamento para região de maior blindagem do sinal do nitrogênio imínico ($\text{N}^2=\text{C}$) após a coordenação, corroborando com a proposta de coordenação *N,S*-bidentada desse ligante. Da mesma forma, observa-se o deslocamento do sinal do nitrogênio da 1,10-fenantrolina de 313,13 ppm (phen livre) para 269,71 ppm em **1**, indicando sua coordenação ao íon prata (I) (MAKEDONAS; MITSOPOULOU, 2006).

Portanto, os dados espectroscópicos de RMN evidenciam a coordenação *N,S*-bidentada das tiossemicarbazonas e *N,N*-bidentada da 1,10-fenantrolina a prata (I) nos complexos **1–3**.

O comportamento dos complexos de prata (I) em solução também foi analisado por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS). Os espectros de ESI-MS de **1–3** foram obtidos em soluções de metanol e são apresentados na Figura 30. Foram observados os íons moleculares em $m/z = 468,00$ (**1**); $m/z = 482,04$ (**2**) e $m/z = 496,02$ (**3**) correspondente ao íon $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L})]^+$, revelando a estrutura mononuclear em solução dos complexos **1–3**. O padrão isotópico típico da prata foi observado para todos os compostos, dois sinais com proporção aproximadamente 1:1 e com diferença de 2 unidades de massa. Portanto,

os dados de ESI-MS corroboram com a proposta que **1–3** são complexos tetracoordenados do tipo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L})]^+$ em solução.

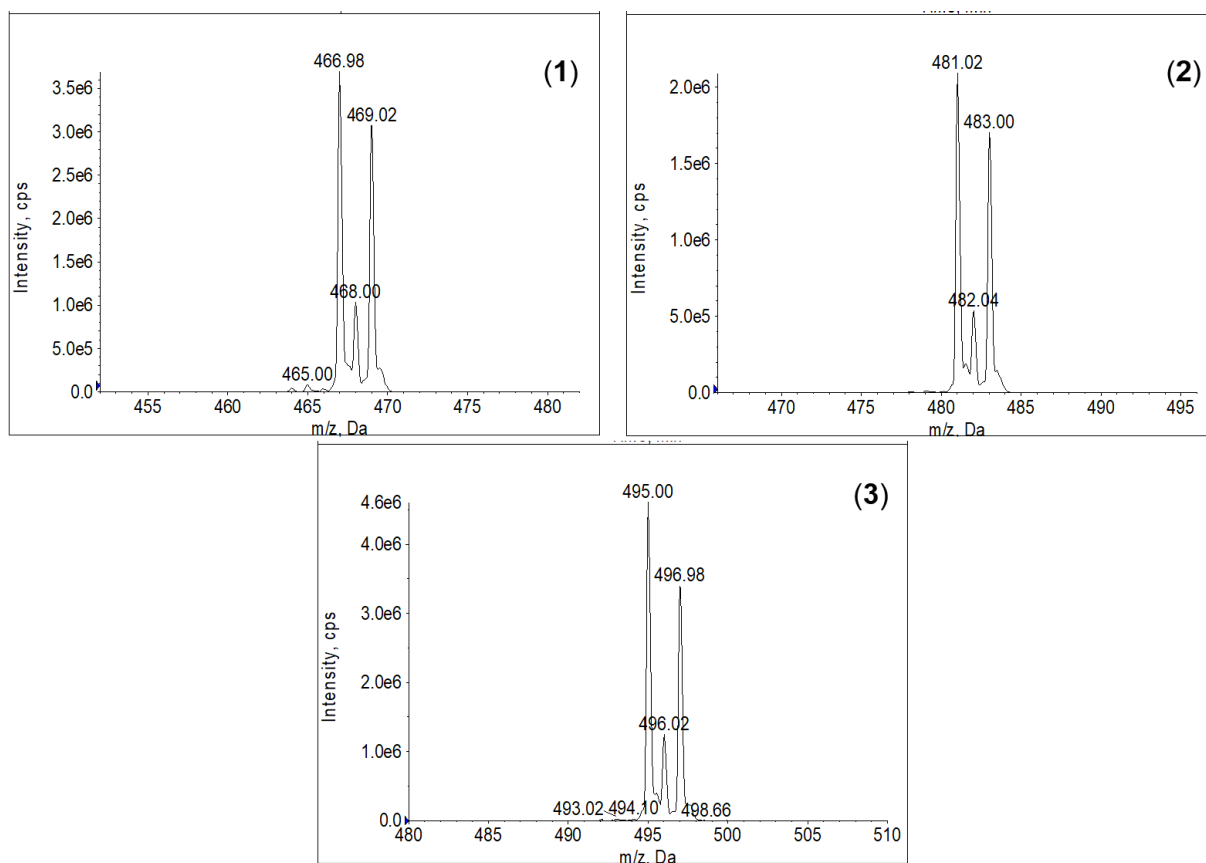
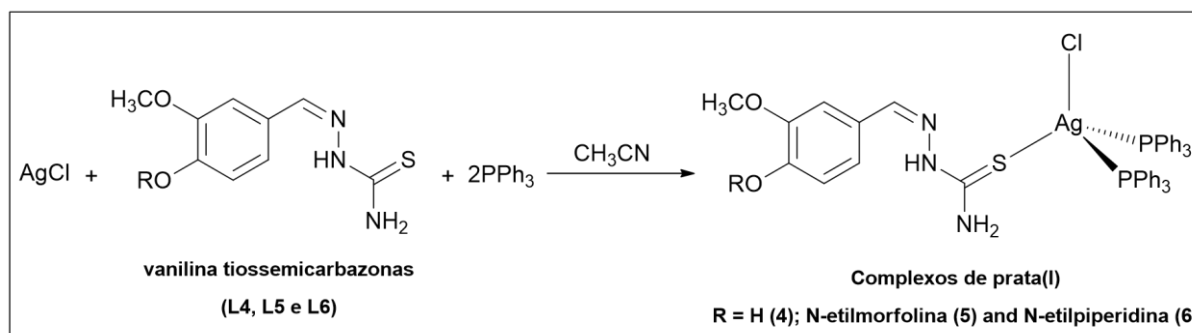


Figura 30 - Espectros de ESI-MS dos compostos **1–3** em solução de metanol. **Fonte:** Autor.

4.2.3 Síntese dos complexos do tipo $[AgCl(PPh_3)_2(L4-L6)]$

Os compostos **4–6** foram sintetizados reagindo AgCl, vanilina tiossemicarbazonas {**L4** = 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (**4**); **L5** = 3-metoxi-4-[2-(1-morfolinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona (**5**) **L6** = e 3-metoxi-4-[2-(1-piperidinil)etóxi]benzaldeído tiossemicarbazona (**6**)} e trifenilfosfina (PPh_3) na razão molar 1:1:2, respectivamente (Esquema 4).



Esquema 4 - Síntese dos complexos derivados da trifenilfosfina. **Fonte:** Autor.

Trabalhos anteriormente reportados na literatura de complexos do tipo $[AgX(PPh_3)_2(TSC)]$ ($X = Cl; Br$) demonstraram que o haleto compete com o átomo doador de enxofre da tiossemicarbazona para coordenação a prata (I). Logo, haletos de prata (I) formam complexos em que o ligante tiossemicarbazona coordena-se na forma neutra *S*-monodentada. Tal modo de coordenação pode ser explicado pelo caráter de ácido de Pearson macio do íon Ag^I . Além disso, interações intermoleculares do tipo $NH \cdots X$ ($X = Cl; Br$) mostraram ser importantes para a estabilização das estruturas cristalinas desses compostos.

A reação entre o cloreto de prata e **L4** resultou na formação de um precipitado branco, por outro lado, a reação com os ligantes **L5** e **L6** levaram a formação de produtos solúveis em acetronitrila. Esse aumento de solubilidade é resultado da funcionalização dos ligantes. A reação subsequente do produto $[AgCl(L4)]$ com o ligante PPh_3 levou a formação imediata de um produto solúvel em acetoneitrila, o qual foi mantido no escuro para evaporação do solvente, obtendo um sólido branco. A reação entre os produtos $[AgCl(L5)]$ e $[AgCl(L6)]$ com o ligante PPh_3 também resultou em produtos solúveis, e após algumas horas da solução mãe em repouso no escuro foram obtidos cristais dos compostos **5** e **6**. Os complexos são sólidos estáveis e são solúveis em solventes orgânicos como metanol, dimetilsufóxido, dimetilformamida, acetoneitrila, etanol.

Os dados de análise elementar (Tabela 7) confirmaram a fórmula proposta para os compostos **4–6**. Além disso, os resultados mostraram que o complexo **6** apresenta uma molécula de acetronitrila na composição.

Tabela 7 - Rendimento, massa molar e dados de análise elementar (CHN) dos complexos **4–6**.

Compostos	Rend. (%)	MM (g mol ⁻¹)	Análise elementar ^a		
			%C	%H	%N
[AgCl(PPh ₃) ₂ (L4)] (4)	40	893,16	59,94 (60,51)	4,77 (4,63)	4,69 (4,70)
[AgCl(PPh ₃) ₂ (L5)] (5)	48	1006,31	58,08 (60,87)	5,20 (5,21)	5,38 (5,57)
[AgCl(PPh ₃) ₂ (L6)]·CH ₃ CN (6)	53	1045,39	61,92 (62,04)	5,48 (5,50)	6,54 (6,70)

^a valores calculados entre parênteses. **Fonte:** Autor.

Os complexos de prata (I) **4–6** foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros no IV de **4–6** são apresentados na Figura 31. A Tabela 8 apresenta as principais frequências vibracionais que indicam a coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas e trifenilfosfina a prata (I).

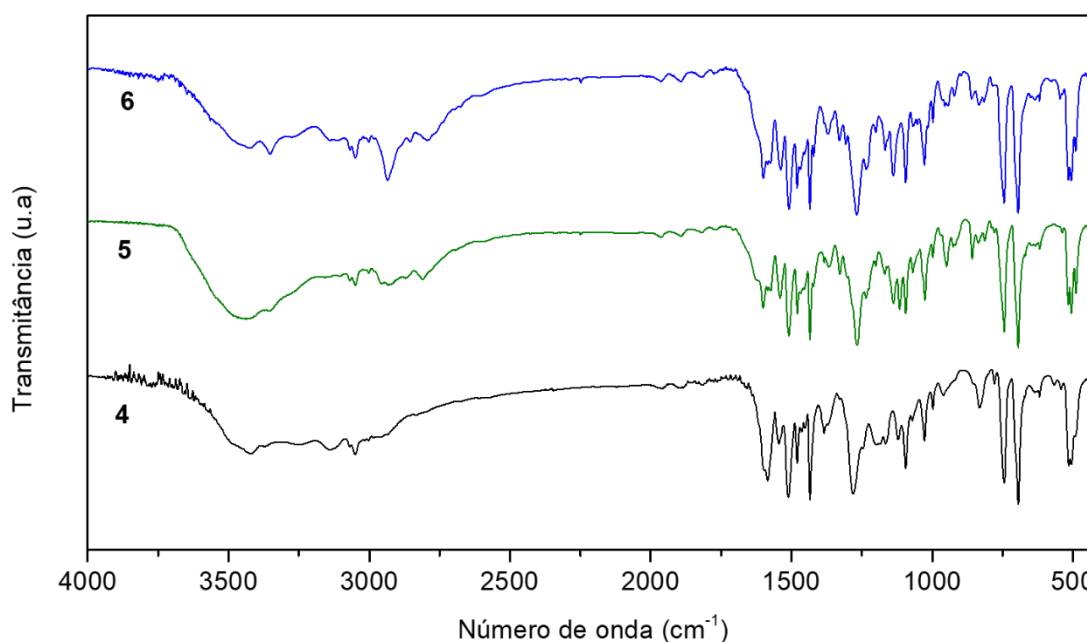


Figura 31 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **4–6** em KBr. **Fonte:** Autor.

As principais evidências da coordenação das tiossemicarbazonas nos espectros no IV dos compostos **4–6** são as bandas de $\nu(\text{C}=\text{N})$ e $\nu(\text{C}=\text{S})$. A coordenação via átomo de enxofre foi

apontada pelo deslocamento da banda $\nu(\text{C}=\text{S})$ de $758 - 780 \text{ cm}^{-1}$ (ligantes livres) para 745 cm^{-1} nos complexos, revelando o enfraquecimento da ligação CS. Além disso, a coordenação S-monodentada das tiossemicarbazonas no estado sólido foi evidenciada pela absorção $\nu(\text{C}=\text{N})$, visto que não foi observado nenhum deslocamento dessa banda após a complexação.

A coordenação do ligante trifenilfosfina nos compostos **4–6** foi confirmada pela presença de bandas características de $\nu(\text{P}-\text{C}_{\text{Ph}})$ em 1095 cm^{-1} . A banda de deformação do anel (γ_{anel}) em 691 cm^{-1} também foi observada para os complexos.

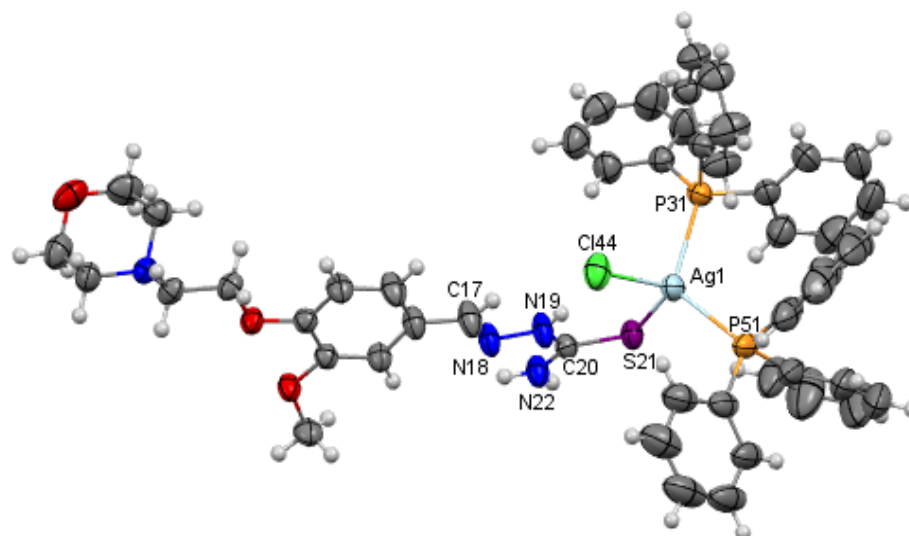
Tabela 8- Atribuição das principais frequências vibracionais presentes nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e complexos **4–6**.

Compostos	$\nu(-\text{N}^3\text{HR})$	$\nu(-\text{N}^2\text{H}-)$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\nu(\text{P}-\text{C})$	γ_{anel}
L4	3278	3155	1600	780	-	
L5	3290	3170	1600	766	-	
L6	3290	3170	1598	758	-	
4	-	-	1600	745	1095	691
5	-	-	1600	745	1095	691
6	-	-	1600	745	1095	691

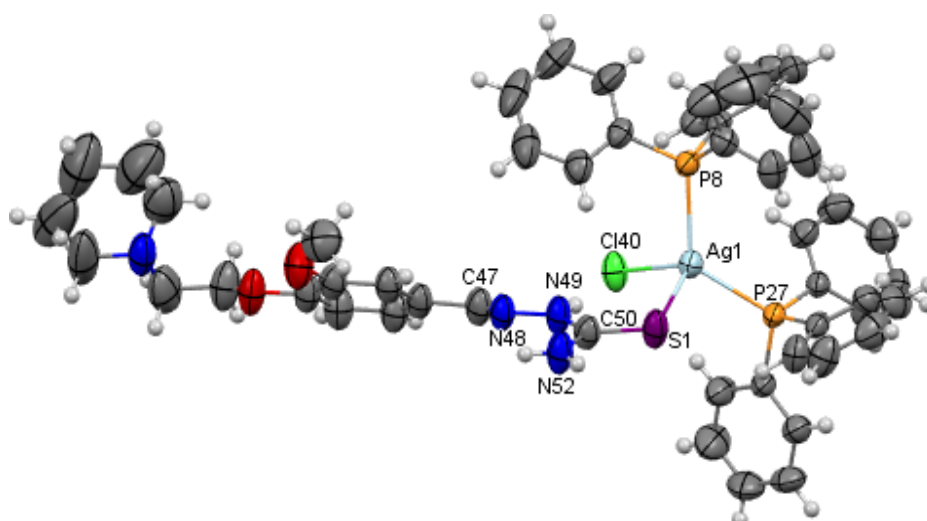
ν = estiramento; γ = deformação fora do plano. **Fonte:** Autor.

Cristais dos compostos **5** e **6** foram analisados por difração de raios X em monocristal. Os diagramas ORTEP dos complexos de prata são apresentados na Figura 32. Os dados cristalográficos são listados no Apêndice 15. As distâncias e ângulos de ligação selecionados dos complexos são apresentados na Tabela 9.

Ambos os complexos de prata são compostos mononucleares do tipo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L})]$. O átomo de prata apresenta geometria de coordenação tetraédrica distorcida, evidenciada pelos ângulos de ligação entre $99,8^\circ$ e $124,21^\circ$. Nos complexos **5** e **6**, os ligantes tiossemicarbazonas estão coordenados a prata (I) via átomo de enxofre em modo S-monodentada na forma neutra. Dois átomos de fósforo de duas moléculas de trifenilfosfina e um ligante clorido ocupam os outros sítios de coordenação.



(5)



(6)

Figura 32 - Projeção ORTEP dos complexos **5** e **6** mostrando a numeração dos átomos ao redor do centro metálico Ag^I e elipsoides em nível de probabilidade de 50%. **Fonte:** Autor.

As distâncias de ligação Ag-S para **5** e **6** apresentaram valores de 2,6013 e 2,6325 Å, respectivamente. As distâncias de ligação Ag-P nos complexos **5** e **6** exibiram valores entre 2,4661 e 2,4917 Å. Esses valores são próximos aos reportados para complexos de prata (I) semelhantes contendo tiossemicarbazonas monodentadas neutras [AgCl(κ^1 -SL)(PPh₃)₂] (L = 2-piridina carboxaldeído tiossemicarbazona) e [AgCl(η^1 -S-HIntsc)(PPh₃)₂] (HIntsc = 3-metil-indol tiossemicarbazona) (LOBANA et al., 2008b; KHAN et al., 2018).

A coordenação de dois ligantes volumosos trifenilfosfina ao íon Ag^I leva a distorção da geometria tetraédrica ao redor do centro metálico, resultando em ângulos P-Ag-P significativamente maiores que 109°. Particularmente, os ângulos P(51)-Ag(1)-P(31) em **5** e

P(27)-Ag(1)-P(8) em **6** são iguais a 115,35° e 124,21°, respectivamente. Por consequência, ângulos iguais a 103,89° e 99,80° são observados para os fragmentos P(31)-Ag(1)-Cl(44) em **5** e P(27)-Ag(1)-S(1) em **6**, respectivamente. Além disso, ligações de hidrogênio intramolecular entre o ligante clorido e o grupo NH das tiossemicarbazonas para os compostos **5** e **6** levam a formação de um anel de seis membros.

Tabela 9 - Distâncias de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) dos complexos **5** e **6**.

5	Distâncias (Å)		Ângulos (°)
Ag(1) – S(21)	2,601(7)	P(31) – Ag(1) – S(21)	107,06(2)
Ag(1) – P(31)	2,491(7)	P(31) – Ag(1) – Cl(44)	103,89(3)
Ag(1) – Cl(44)	2,589(8)	Cl(44) – Ag(1) – S(21)	107,86(2)
Ag(1) – P(51)	2,475(7)	P(51) – Ag(1) – S(21)	109,04(2)
C(17) – N(18)	1,269(3)	P(51) – Ag(1) – P(31)	115,35(3)
C(20) – S(21)	1,688(3)	P(51) – Ag(1) – Cl(44)	113,21(3)
C(20) – N(19)	1,328(3)		
C(20) – N(22)	1,316(3)		
6			
Ag(1) – S(1)	2,632(8)	P(8) – Ag(1) – Cl(40)	100,72(2)
Ag(1) – P(8)	2,479(7)	P(8) – Ag(1) – S(1)	114,40(3)
Ag(1) – Cl(40)	2,572(7)	P(27) – Ag(1) – P(8)	124,21(2)
Ag(1) – P(27)	2,466(6)	P(27) – Ag(1) – Cl(40)	113,22(2)
C(47) – N(48)	1,266(4)	P(27) – Ag(1) – S(1)	99,80(2)
C(50) – S(1)	1,686(3)	Cl(40) – Ag(1) – S(1)	103,09(2)
C(50) – N(49)	1,335(3)		
C(50) – N(52)	1,315(3)		

Fonte: Autor.

Os ligantes tiossemicarbazonas **L5** e **L6** são compostos inéditos na literatura. Logo, também foi oportuno fazer a análise desses ligantes nos complexos **5** e **6**. As tiossemicarbazonas são sistemas de alta deslocalização eletrônica, principalmente quando anéis aromáticos estão ligados ao carbono imínico. Já é bem descrito na literatura que a deslocalização de elétrons π provoca efeitos no comprimento de ligações desses compostos (TENÓRIO *et al.*, 2005). Ligações características de tiossemicarbazonas foram observadas para **L5** e **L6**, como a ligação dupla do nitrogênio da imina C(17)-N(18) em **L5** e C(47)-N(48) em **L6**, com distâncias de 1,269 e 1,267 Å, respectivamente. E as ligações C(20)-S(21) em **L5** e C(50)-S(1) em **L6** com distâncias iguais a 1,688 e 1,686 Å, respectivamente. Além disso, as distâncias das ligações C(20)-N(19) de 1,328 Å e C(20)-N(22) de 1,316 Å no ligante **L5** evidenciaram seu caráter

intermediário entre ligação simples e dupla como resultado da deslocalização π nesse sistema. Valores muito próximos são observados para o fragmento N(49)-C(50)-N(52) no ligante **L6**.

O comportamento dos complexos metálicos em solução não é necessariamente o mesmo observado no estado sólido. Logo, os compostos **4–6** também foram caracterizados por espectroscopia de RMN. Os espectros de RMN de ^1H , DEPTQ, HSQC, HMBC e ^{31}P foram adquiridos em DMSO- d_6 . O esquema de numeração utilizado na atribuição dos sinais é apresentado na Figura 33.

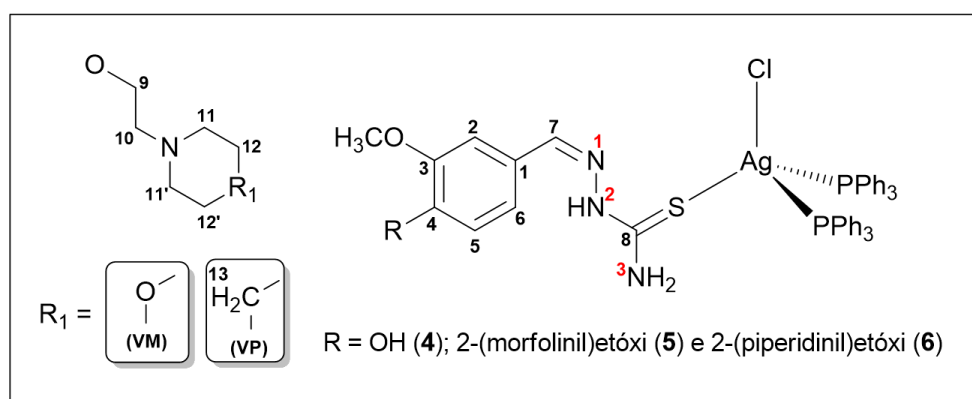


Figura 33 - Representação da numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes dos compostos **4–6**. Fonte: Autor.

Todos os sinais e integrais esperados para complexos do tipo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ em solução foram observados nos espectros de RMN de ^1H de **4–6** (Figura 34–36). Além disso, uma única espécie em solução é apontada pela presença de apenas um conjunto de sinais para os ligantes tiossemicarbazonas e trifenilfosfina.

O hidrogênio hidrazínico ($=\text{N-NH}$) foi observado como um singlete em 11,6 – 11,8 ppm, e dois singletos entre 8,1 e 8,6 ppm foram atribuídos aos hidrogênios da tioamida ($-\text{NH}_2$). Um singlete em ca. 8 ppm foi atribuído ao hidrogênio imínico ($\text{HC}=\text{N}$). Os hidrogênios aromáticos da vanilina (H2, H5, H6) foram observados na região de 6,7 – 7,5 ppm, e o sinal do grupo metóxi em ca. 3,8 ppm nos espectros de **4–6**. Os sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos dos grupos N-etilmorfolina/piperidina foram observados entre 4,1 – 1,4 ppm para **5** e **6**. Os sinais na região aromática na faixa de 7,3 – 7,5 ppm evidenciaram a coordenação do ligante trifenilfosfina a prata (I). Os dados dos espectros de RMN de ^1H são apresentados na Tabela 10.

Após a coordenação, foi observado um deslocamento de ca. 0,3–0,4 ppm do hidrogênio hidrazínico ($=\text{N-NH}$) para região de menor blindagem indicando que as tiossemicarbazonas

estão coordenadas a prata (I) como ligantes neutros (LOBANA et al., 2009a). Outra evidência da coordenação da tiossemicarbazona via átomo de enxofre a prata (I) é o deslocamento dos sinais do hidrogênio da tioamida (-NH_2) para região de menor blindagem. Por outro lado, não houve mudanças significativas do sinal do hidrogênio da imina (HC=N).

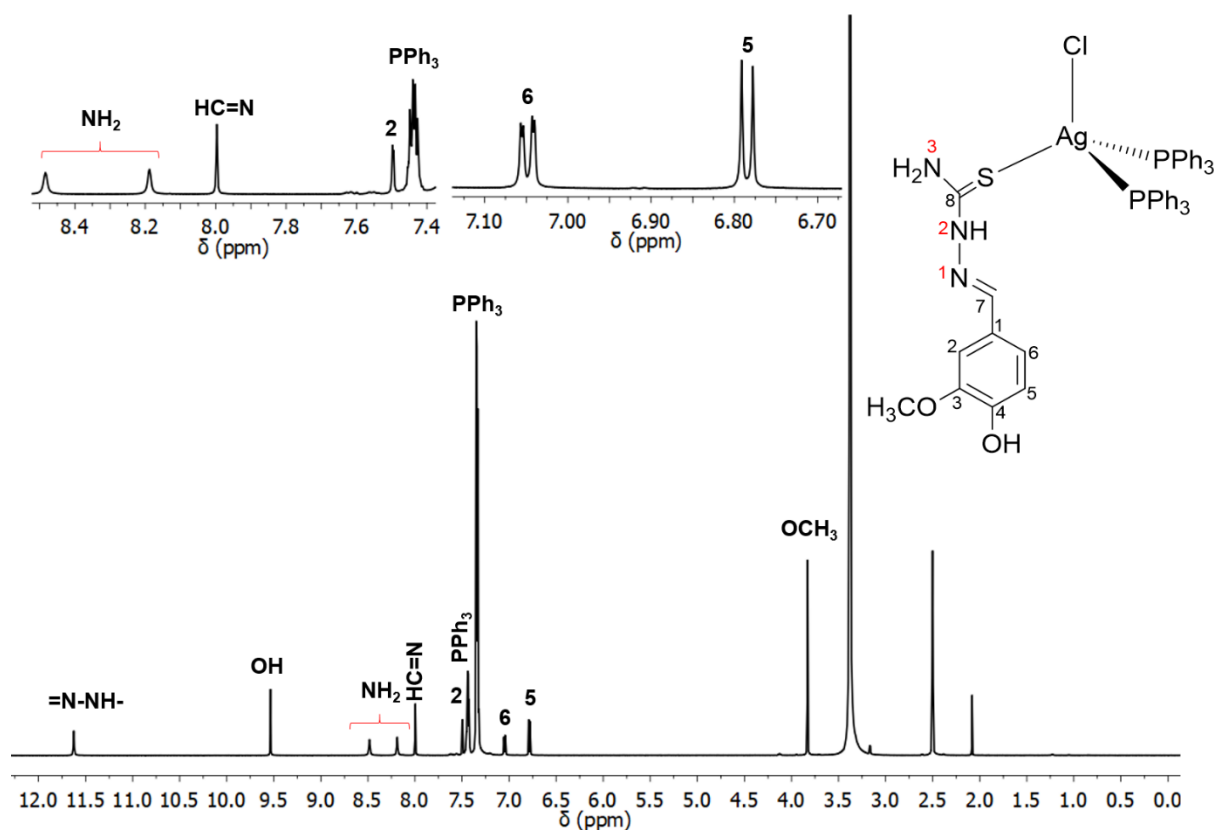


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 4 em solução de DMSO-d_6 . **Fonte:** Autor

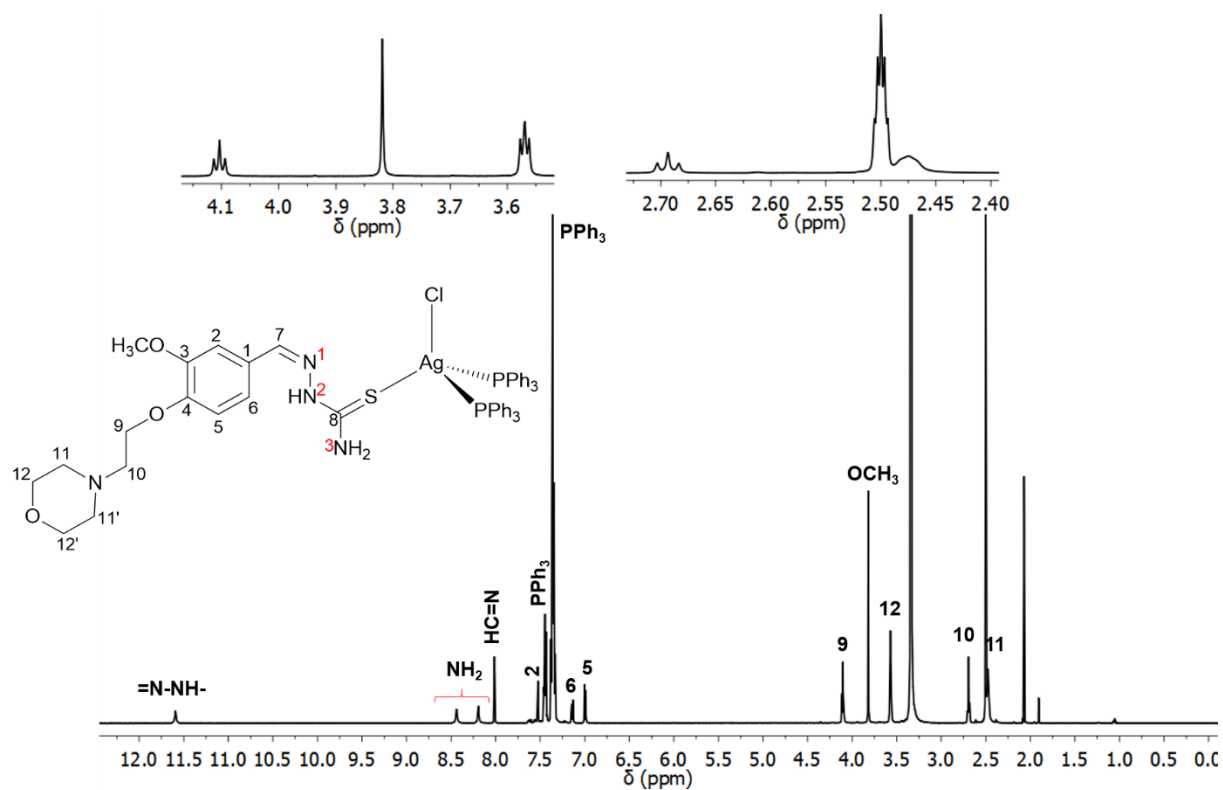


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **5** em solução de DMSO-d_6 . **Fonte:** Autor.

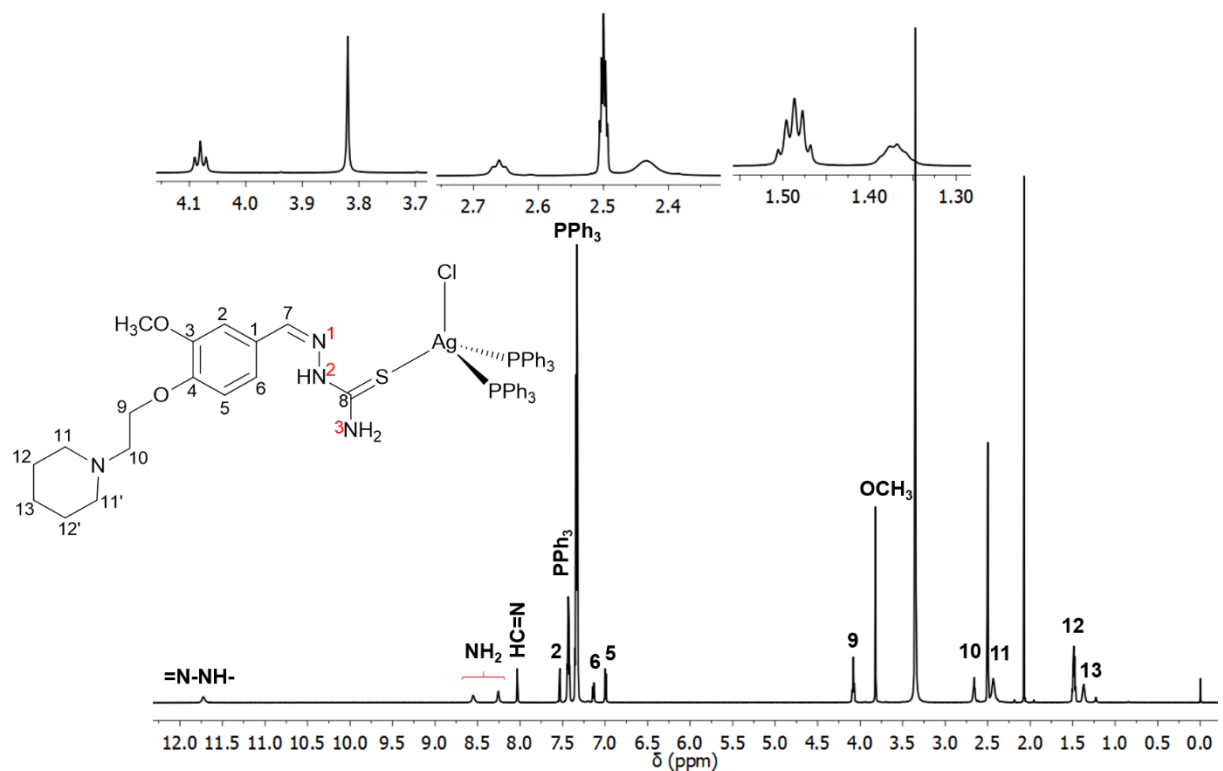


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **6** em solução de DMSO-d_6 . **Fonte:** Autor.

Tabela 10 - Dados dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **4–6** e tiossemicarbazonas em DMSO- d_6 . Deslocamento químico (ppm), multiplicidade, integral (nH) e constante de acoplamento (J, Hz).

Atribuição	L4	(4)	L5	(5)	L6	(6)
=N-NH	11,26 (s, 1H)	11,62 (s, 1H)	11,31 (s, 1H)	11,60 (s, 1H)	11,31 (s, 1H)	11,73 (s, 1H)
OH	9,49 (s, 1H)	9,53 (s, 1H)	-	-	-	-
NH ₂	8,11 e 7,96 (s, 2H)	8,48 e 8,19 (s, 2H)	8,16 e 8,02 (s, 2H)	8,44 e 8,19 (s, 2H)	8,15 e 8,02 (s, 2H)	8,54 e 8,26 (s, 2H)
HC=N	7,93 (s, 1H)	8,00 (s, 1H)	7,96 (s, 1H)	8,01 (s, 1H)	7,95 (s, 1H)	8,03 (s, 1H)
H2	7,47 (d, 1H) (J = 1,8)	7,50 (d, 1H) (J = 1,8)	7,51 (d, 1H) (J = 1,8)	7,53 (d, 1H) (J = 1,8)	7,51 (d, 1H) (J = 1,8)	7,53 (d, 1H) (J = 1,8)
PPh ₃	-	7,44 (m, 6H)	-	7,45 (m, 6H)	-	7,43 (m, 6H)
PPh ₃	-	7,34 (m, 24H)	-	7,36 (m, 24H)	-	7,33 (m, 24H)
H6	7,02 (dd, 1H) (J = 8,2; 1,8)	7,04 (dd, 1H) (J = 8,0; 1,8)	7,11 (dd, 1H) (J = 8,4; 1,8)	7,13 (dd, 1H) (J = 8,4; 1,8)	7,11 (dd, 1H) (J = 8,4; 1,8)	7,13 (dd, 1H) (J = 8,4; 1,8)
H5	6,78 (d, 1H) (J = 8,2)	6,79 (d, 1H) (J = 8,0)	6,99 (d, 1H) (J = 8,4)	6,99 (d, 1H) (J = 8,4)	6,98 (d, 1H) (J = 8,4)	7,00 (d, 1H) (J = 8,4)
H9			4,09 (t, 2H) (J = 6,0)	4,1 (t, 2H) (J = 4,5)	4,07 (t, 2H) (J = 6,0)	4,08 (t, 2H) (J = 6,0)
OCH ₃	3,82 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)	3,81 (s, 3H)	3,82 (s, 3H)	3,81 (s, 3H)	3,82 (s, 3H)
H12			3,57 (t, 4H) (J = 4,5)	3,57 (t, 4H) (J = 4,5)	1,48 (q, 4H) (J = 6,0)	1,49 (q, 4H) (J = 6,0)
H10			2,69 (t, 2H) (J = 6,0)	2,69 (t, 2H) (J = 6,0)	2,65 (t, 2H) (J = 6,0)	2,66 (t, 2H) (J = 6,0)
H11			2,46 (b, 4H)	2,47 (b, 4H)	2,43 (b, 4H)	2,44 (b, 4H)
H13					1,37 (b, 2H)	1,37 (b, 2H)

s = singlete; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; dd = duplo dublete; b = sinal alargado. **Fonte:** Autor.

Todos os sinais de ^{13}C esperados para os compostos **4–6** foram observados nos espectros de DEPTQ (Figura 37–39). A atribuição desses sinais foi realizada a partir da análise das correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C registradas via mapas de contorno HSQC e HMBC (Apêndice 16 e 17). Os sinais do carbono da tioamida (CS) foram observados em 175,97 (**4**), 176,40 (**5**) e 176,03 ppm (**6**). Os sinais em 144,15 (**4**), 143,50 (**5**) e 143,79 ppm (**6**) foram atribuídos ao carbono azometínico ($\text{HC}=\text{N}$). Os sinais dos carbonos aromáticos da vanilina e trifenilfosfina foram observados na faixa de 108 – 151 ppm, e o carbono do grupo metóxi em 55,78 ppm para **4–6**. Foram observados quatro sinais para os grupos metilenos da N-etilmorfolina em δ 53,68; 56,95; 66,17 e 66,19 ppm em **5**. E os sinais em δ 23,92; 25,56; 54,46; 57,31 e 66,30 ppm em **6** foram atribuídos aos carbonos dos grupos metilenos da N-etilpiperidina.

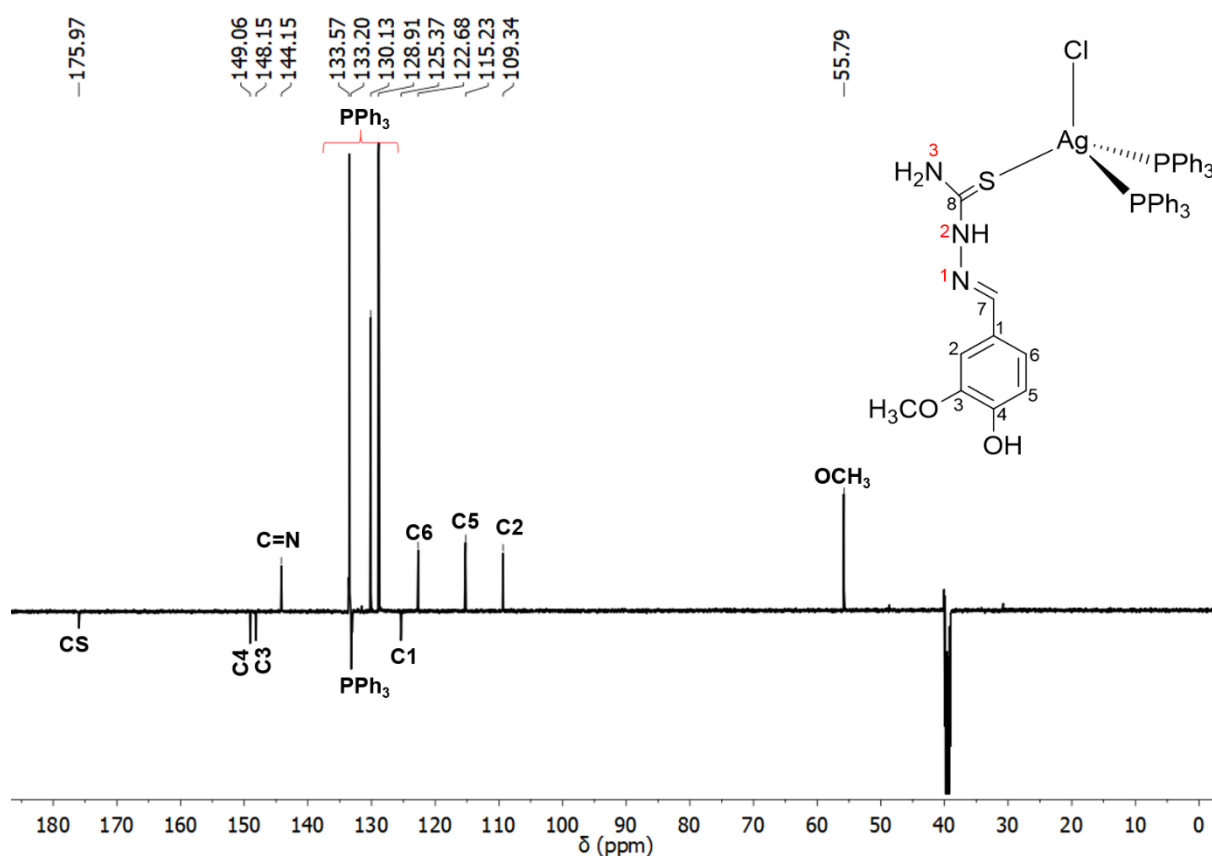


Figura 37 - Espectro de DEPTQ do complexo **4** em solução de DMSO-d_6 . **Fonte:** Autor.

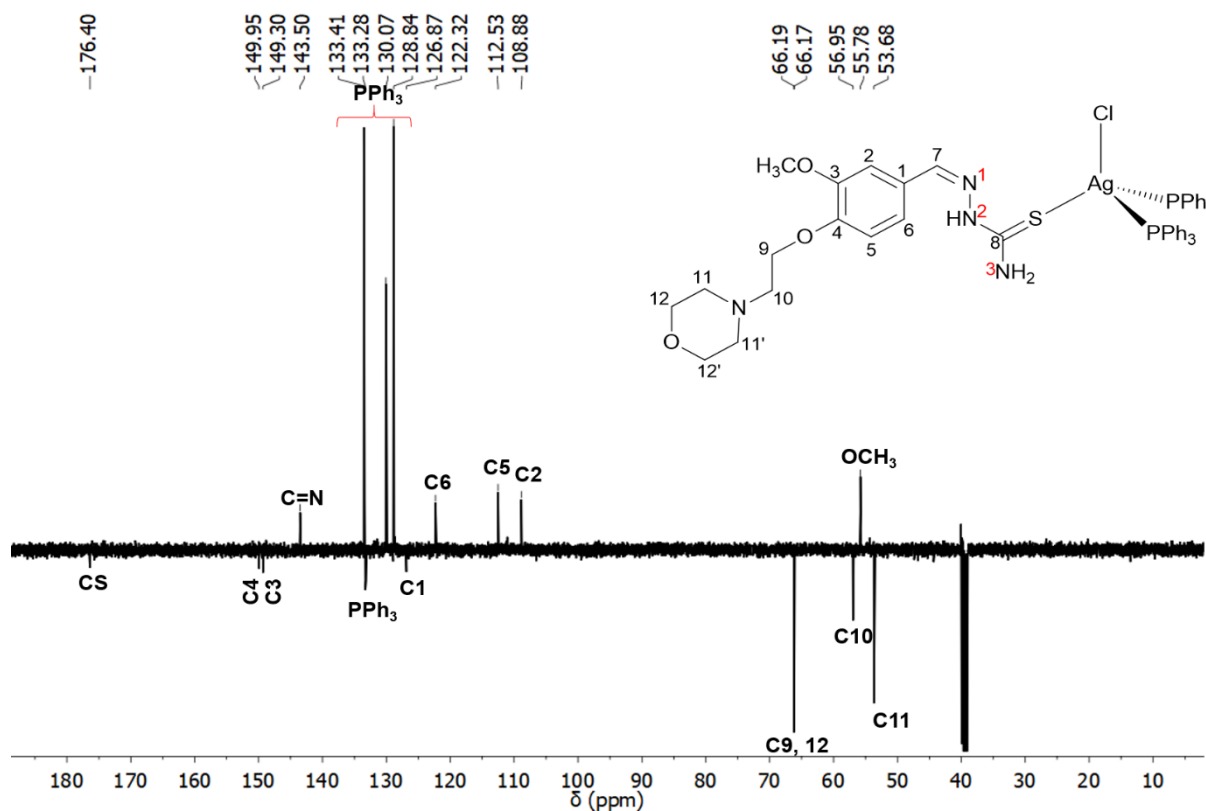


Figura 38 - Espectro de DEPTQ do complexo 5 em solução de DMSO-d_6 . Fonte: Autor.

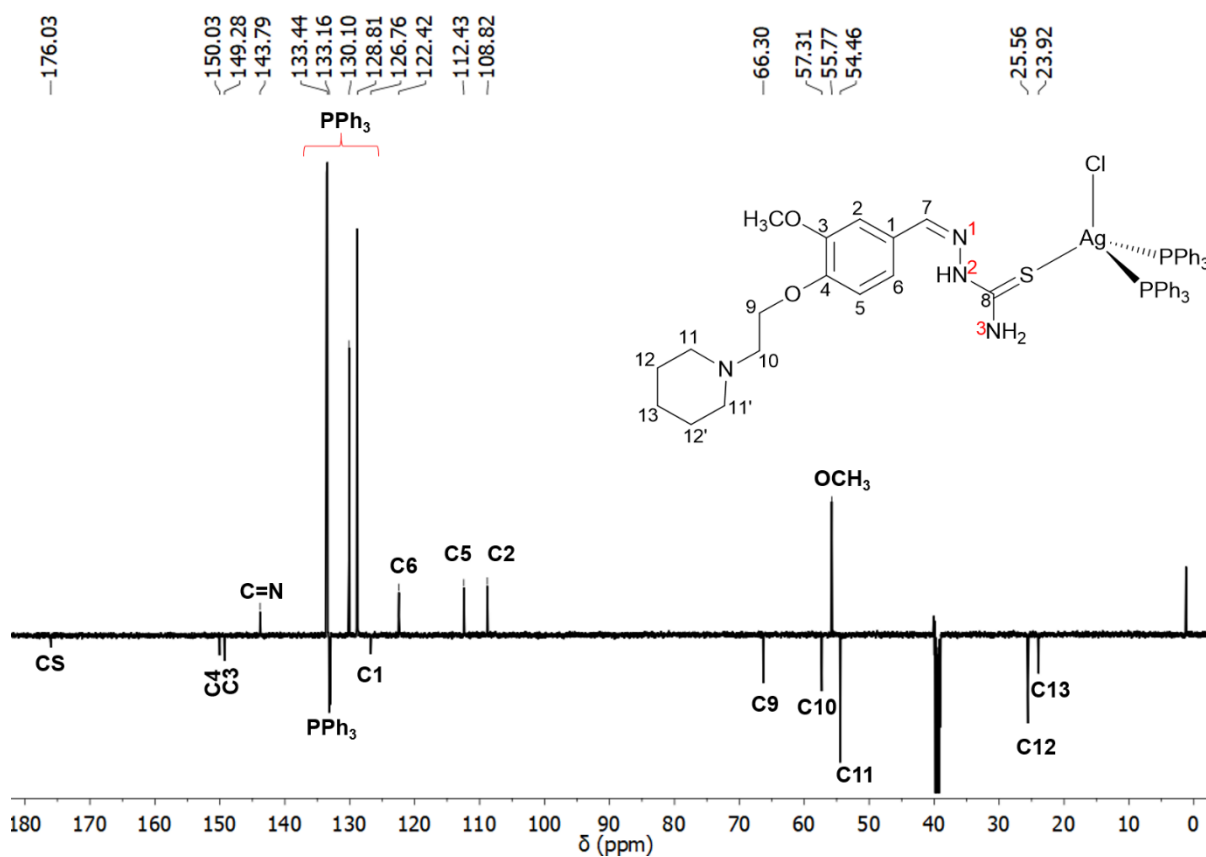


Figura 39 - Espectro de DEPTQ do complexo 6 em solução de DMSO-d_6 . Fonte: Autor.

As principais evidências sobre o modo de coordenação das tiossemicarbazonas nos complexos **4–6** são os sinais CS e HC=N (Tabela 11). O deslocamento de ca. 1,1–1,5 ppm do sinal CS para região de maior blindagem em comparação aos ligantes livres, indica o enfraquecimento da ligação C=S como resultado da formação da ligação Ag-S (SEGURA *et al.*, 2014). Também foi observado um deslocamento de ca. 1,1–1,5 para região de menor blindagem do carbono azometínico (HC=N), tal mudança sugere que o nitrogênio imínico encontra-se coordenado ao íon Ag^I em solução. Essas mudanças nos carbonos CS e HC=N após a complexação indicam que as tiossemicarbazonas estão coordenadas de modo N,S-bidentado nos compostos **4–6** em solução.

Tabela 11 - Atribuição dos principais sinais de ¹³C dos ligantes tiossemicarbazonas e complexos **4–6**. (δ (ppm), DMSO-d₆).

Atribuição	L4	4	L5	5	L6	6
CS	177,38	175,97	177,53	176,40	177,51	176,03
CH=N	142,97	144,15	142,52	143,50	142,53	143,79

Fonte: Autor.

Complexos do tipo AgX(PR₃)_n (PR₃ = ligantes fosfinas) são conhecidos por serem cineticamente lábeis em solução, sendo possível que várias espécies existam em solução através do equilíbrio de troca rápida dos ligantes. Devido ao acoplamento (¹⁰⁷Ag, ¹⁰⁹Ag)–P, os espectros de RMN de ³¹P em solução de complexos de prata (I) contendo ligantes fosfina são tipicamente caracterizados por um par de dupletos para cada ambiente de fósforo. Porém, a labilidade cinética das fosfinas monodentadas geralmente leva a uma rápida troca de ligantes na escala de tempo de RMN e baixas temperaturas são necessárias para a resolução do acoplamento prata-fósforo (ARDIZZOIA, 1997; PAPATHANASIOU, 1997; MCFARLANE, 1998). Os espectros de RMN de ³¹P dos compostos **4–6** (Figura 40) a temperatura ambiente exibiram um singlete em δ 4,8 – 2,9 ppm, evidenciando a rápida troca intermolecular dos ligantes trifenilfosfina nos complexos. A coordenação da trifenilfosfina foi evidenciada pelo deslocamento do sinal em - 6,85 ppm do ligante livre (SAINIS *et al.*, 2016) para região de menor blindagem, após a coordenação densidade eletrônica é retirada do átomo de fósforo.

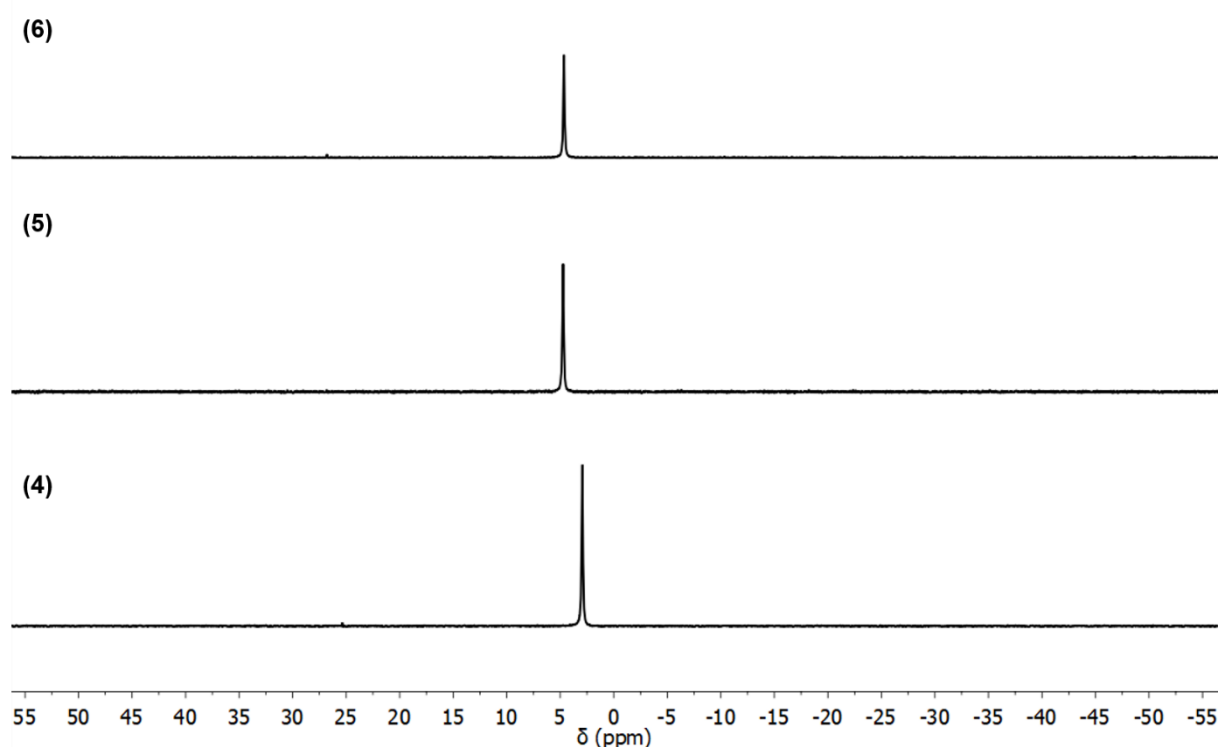


Figura 40 - Espectro de RMN de ³¹P dos compostos **4–6** em solução de DMSO-d₆. **Fonte:** Autor.

4.3 Ensaios de estabilidade em solução

O desenvolvimento de novos complexos de prata bioativos é um desafio, principalmente pela possibilidade de foto-decomposição e/ou precipitação como AgCl no meio biológico. O mecanismo de ação (antibacteriano e citotóxico) dos compostos de prata ainda não foi totalmente elucidado, mas o íon Ag⁺ é apontado como a espécie biologicamente ativa (MEDICI, 2016, 2019). Logo, a atividade dos complexos de prata depende da biodisponibilidade dos íons Ag⁺ e da quantidade de cloreto presente no meio (MIJNENDONCKX *et al.*, 2013). Por exemplo, o uso do AgNO₃ no tratamento de queimaduras é limitado devido a precipitação rápida dos íons Ag⁺ como AgCl no meio biológico, tornando os íons Ag⁺ bioativos indisponíveis (LIANG *et al.*, 2018).

Particularmente, nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, o meio de cultura celular tem uma composição complexa, incluindo sais inorgânicos, aminoácidos, cloreto de sódio e proteínas do soro. Logo, a reatividade dos complexos de prata (I) pode ser afetada pela precipitação como AgCl e interação com proteínas (LEVINA; CRANS; LAY, 2017). Devido a solubilidade limitada dos complexos metálicos em solução aquosa, soluções estoques em DMSO são utilizadas para avaliar a atividade biológica *in vitro* desses compostos. No entanto, esse solvente

também pode atuar como um ligante S-doador para íons metálicos que são ácidos de Pearson macio, tais como Pt^{II} , Ru^{II} , Pd^{II} e Ag^{I} . Logo, ensaios de estabilidade no solvente da solução estoque são tão importantes quanto em meio biológico (PATRA, 2013; HALL, 2014).

A estabilidade dos complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ **1–3** sob condições biologicamente relevantes foi analisada através de experimentos em função do tempo utilizando soluções de DMSO, tampão Tris-HCl (pH 7,4) e meio de cultura DMEM. O período dos testes foi definido em 48 horas, visto que os ensaios biológicos foram realizados com no máximo 48 horas de incubação com os complexos. Devido a baixa solubilidade em solução aquosa, os complexos **1–3** são solubilizados em DMSO para os ensaios biológicos *in vitro*. Assim, é importante investigar se ocorre a troca de ligantes com o solvente DMSO. Os compostos **1–3** foram solubilizados em DMSO-d_6 e seus espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em 0, 24 e 48 h após o preparo das soluções (Figura 41, Apêndice 18). Não foram observadas mudanças nos espectros durante o período de análise, demonstrando que não ocorreu a troca de ligantes com o solvente DMSO em **1–3**. Além disso, não foi observado o escurecimento das soluções após a exposição a luz ambiente.

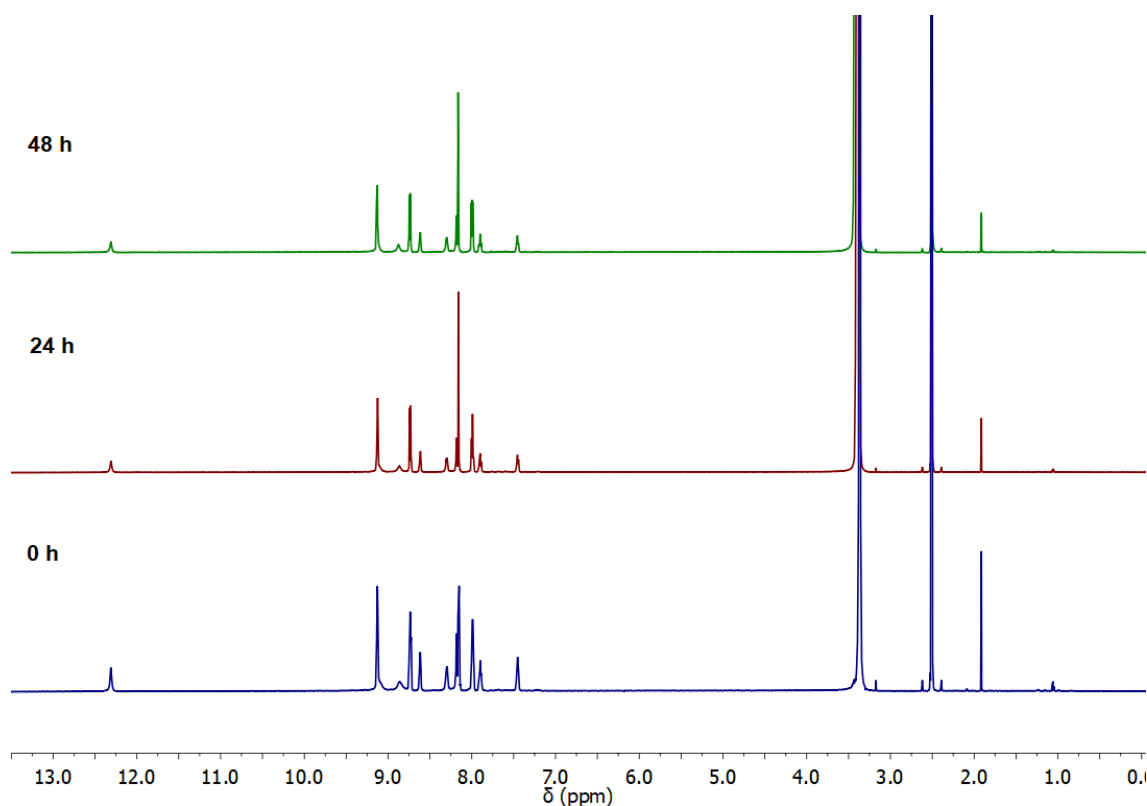


Figura 41 - Teste de estabilidade dos complexos **1–3** em DMSO-d_6 . Espectros de RMN de ^1H do complexo **1** em solução de DMSO-d_6 registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.

Também foi analisado se os compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ são estáveis na presença de íons cloreto. Os espectros de UV-Vis do complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (**1**) (utilizado como representativo) em tampão Tris-HCl (pH 7,4; $[\text{Cl}^-] = 50 \text{ mM}$; 2% DMSO) foram registrados em 0, 24 e 48 h após o preparo das soluções (Figura 42). Não foram observadas mudanças significativas nos espectros de UV-Vis na presença de íons Cl^- , sugerindo que os ligantes phen e tiossemicarbazonas não são facilmente substituídos pelo cloreto. Além disso, a estabilidade do complexo **1** em meio de cultura celular DMEM também foi avaliada. As amostras do complexo **1** foram preparadas em DMEM (95% H_2O , 5% DMSO, 1 mg mL^{-1}) e mantidas por 48 h sob exposição à luz ambiente, imagens das amostras foram registradas em 0, 24 e 48h (Figura 43). Não foi observado nenhum escurecimento aparente das soluções durante esse período, demonstrando que não houve a redução da prata (I).

Esses resultados sugerem que os complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ são estáveis nas condições biológicas estudadas. No entanto, é importante ressaltar que os complexos de prata podem interagir com vários componentes presentes no meio biológico (ex. proteínas), formando novas espécies que podem ser responsáveis pela atividade citotóxica.

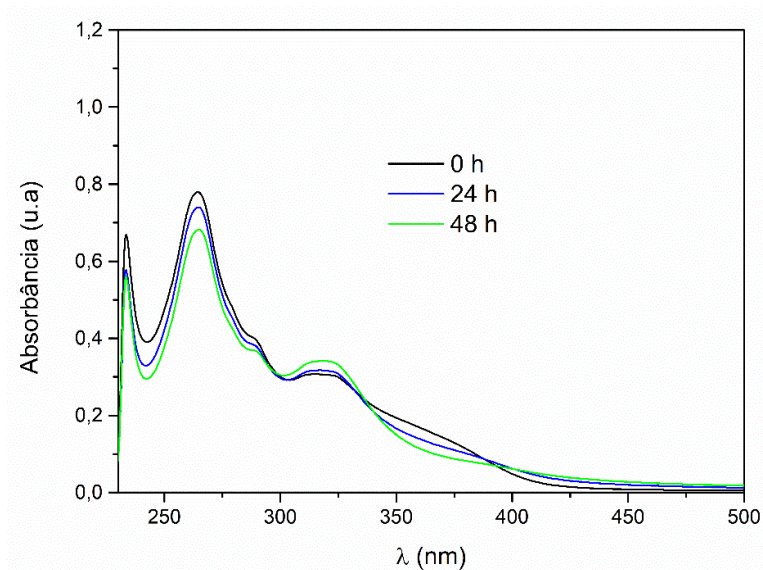


Figura 42 - Teste de estabilidade do complexo **1** em tampão Tris-HCl. Espectros de UV-Vis do complexo **1** em tampão Tris-HCl (pH 7,4; 2% DMSO) registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.

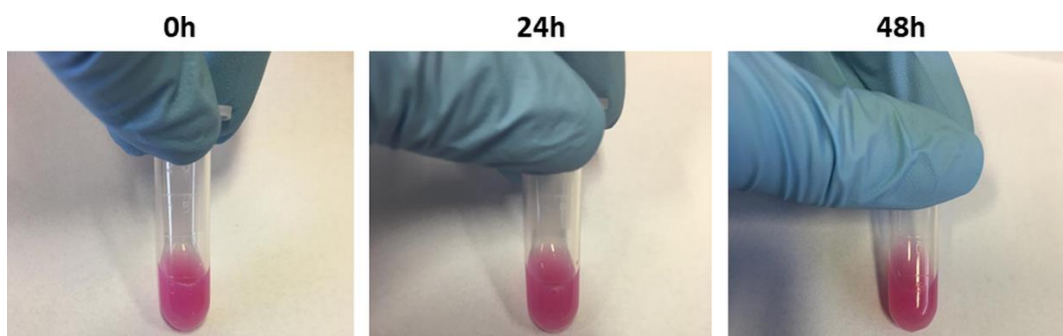
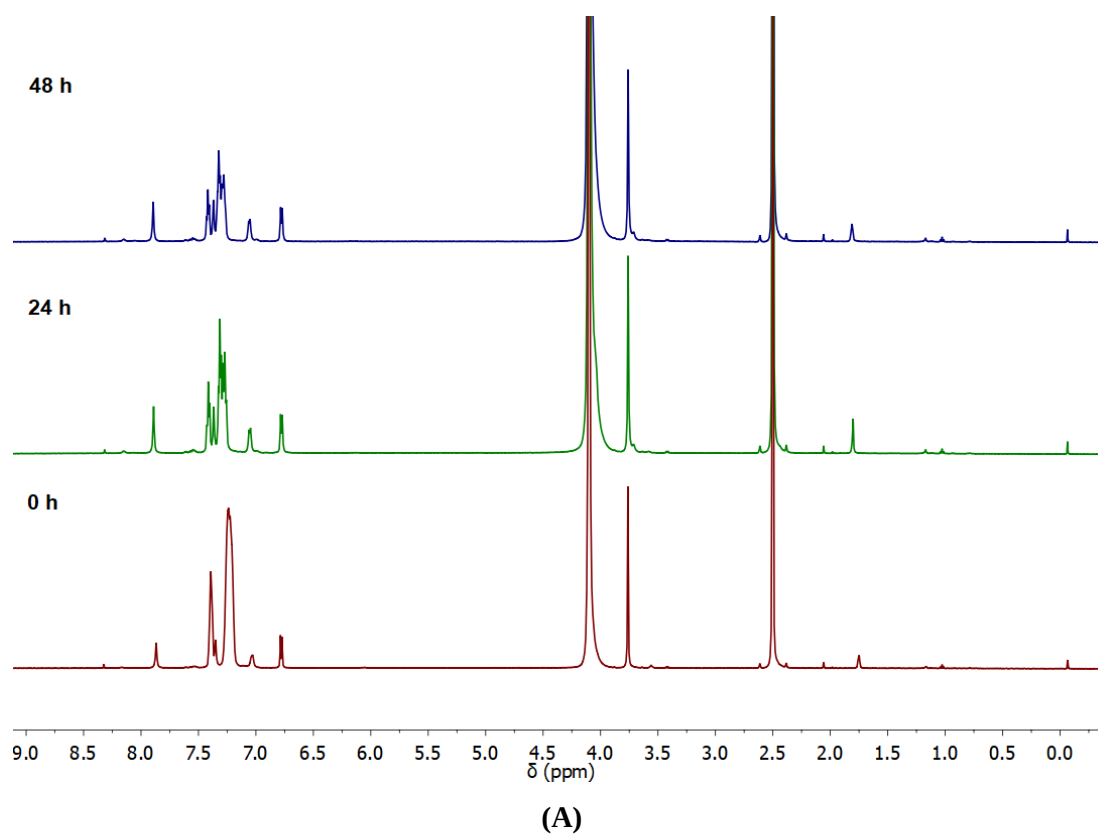
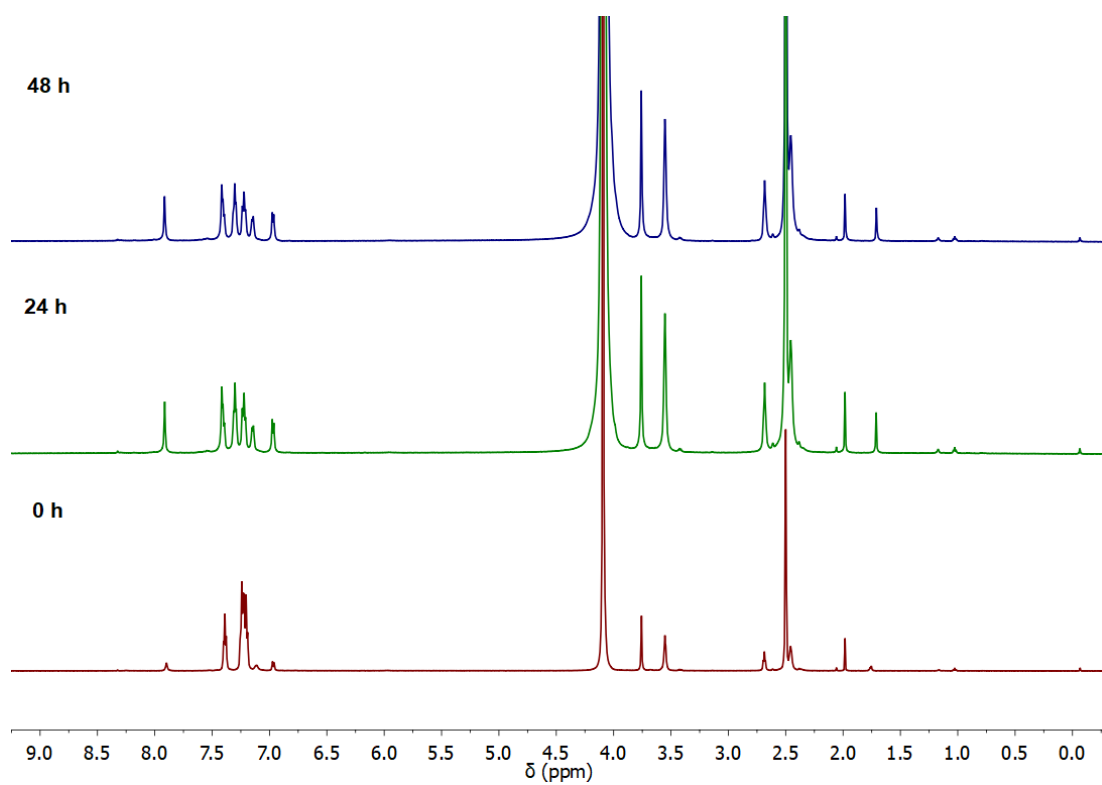


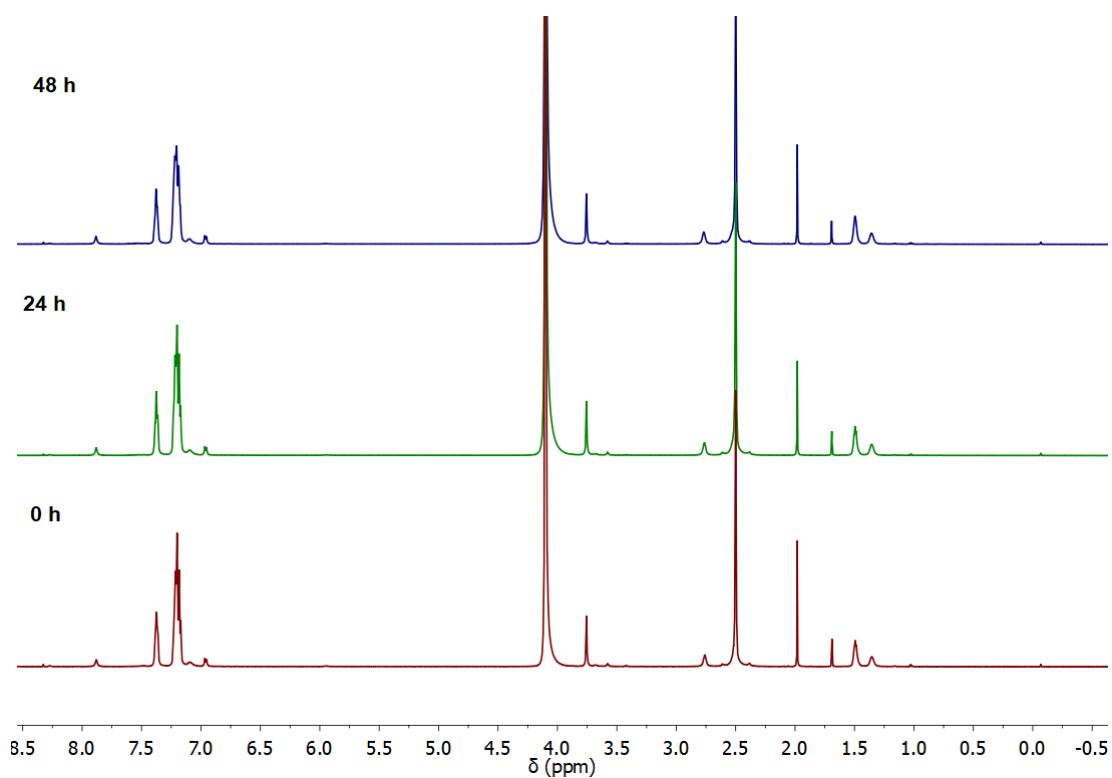
Figura 43 - Teste de estabilidade do complexo **1** em DMEM. Imagens de soluções do complexo **1** (1 mg mL^{-1} , 5% DMSO) em DMEM registradas por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.

A estabilidade dos complexos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ **4–6** em soluções de DMSO/ D_2O e tampão Tris-HCl (pH 7,4) também foi investigada. Os complexos foram solubilizados em uma mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20%, v/v) e seus espectros de RMN de ^1H foram registrados em 0, 24 e 48 h após o preparo das amostras (Figura 44).





(B)



(C)

Figura 44 - Teste de estabilidade dos complexos 4–6 em DMSO- d_6 /D $_2$ O. Espectros de RMN de ^1H dos complexos (A) 4, (B) 5 and (C) 6 em solução de DMSO- d_6 /D $_2$ O (80:20% v/v) registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.

No tempo 0 h, os espectros de **4** e **5** exibiram um multipeto complexo em δ 7,24 ppm referente aos prótons do ligante PPh_3 . Em 24 h foi observado que o multipeto tornou-se relativamente mais resolvido, e não foram identificadas alterações significativas em 48 h. Essa mudança pode ser resultado de uma alteração no modo de coordenação da tiossemicarbazona em solução. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas no espectro de **6**. Para todos os complexos, nenhum sinal referente aos ligantes livres foi detectado, demonstrando que reações de troca de ligantes com o solvente DMSO não ocorrem durante o período de 48 horas.

A estabilidade dos compostos **4–6** também foi verificada na presença de íons cloreto. Os espectros de UV-Vis dos complexos em tampão Tris-HCl (pH 7,4, $[\text{Cl}^-] = 50 \text{ mM}$, 2% DMSO) foram registrados em 0, 24 e 48 h após o preparo das amostras (Figura 45).

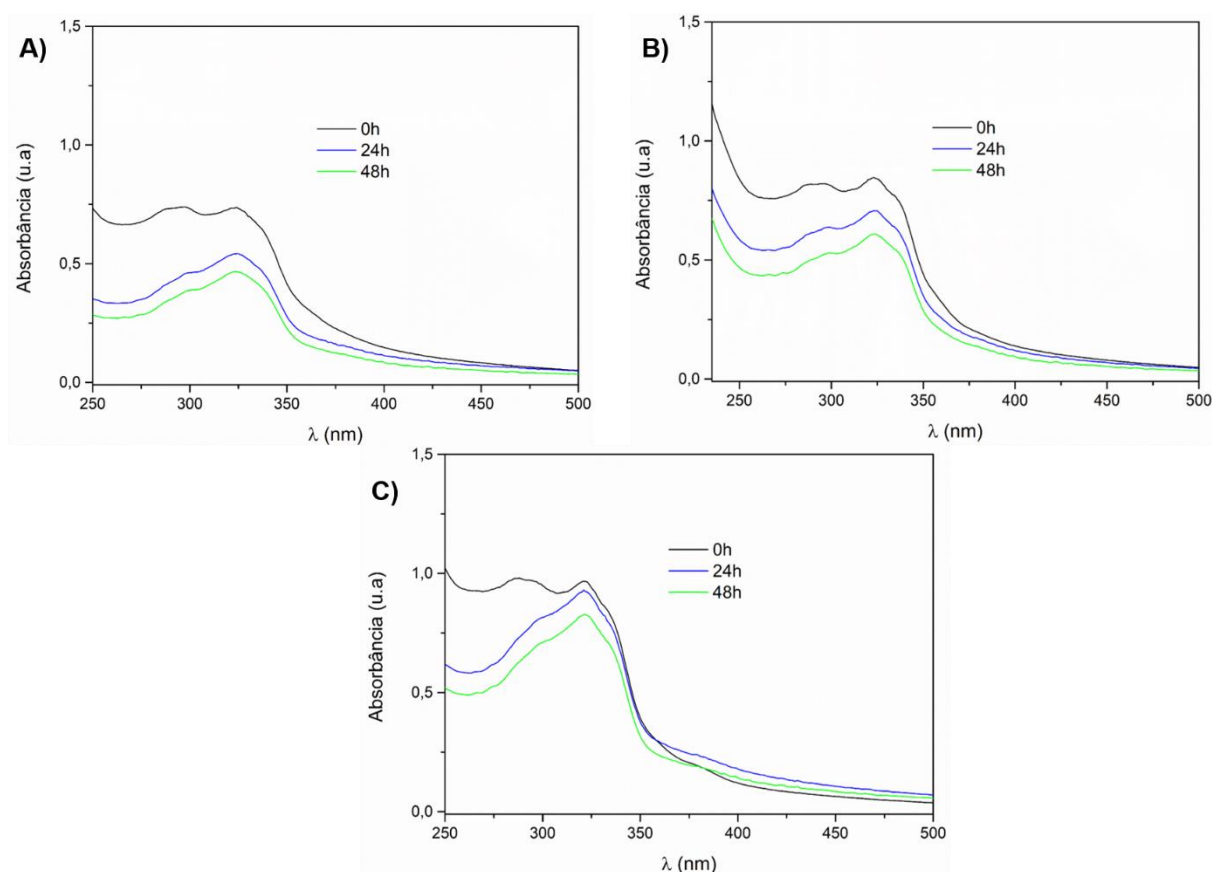


Figura 45 - Teste de estabilidade dos complexos **4–6** em tampão Tris-HCl. Espectros de UV-Vis dos compostos (A) **4**, (B) **5** and (C) **6** em tampão Tris-HCl (pH 7,4; 2% DMSO) registrados por um período de 48 horas. **Fonte:** Autor.

Durante o período de 48 horas em tampão Tris-HCl, a banda em ca. 321 nm diminuiu em intensidade (37% (**4**); 28% (**5**) e 15% (**6**)), essa alteração pode estar associada com a

hidrólise dos complexos ou com a substituição dos ligantes por Cl^- . Entretanto, esses resultados sugerem que uma quantidade considerável dos complexos **4–6** permanece inalterada em solução aquosa na presença de Cl^- .

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Ensaios de citotoxicidade

Ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados para os complexos de prata (I) e ligantes tiossemicarbazonas. O efeito citotóxico dos compostos foi avaliado nas células de mama das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, pulmão da linhagem tumoral A549 e não tumorais da linhagem MCF-10A (Figura 46, Apêndice 18). A viabilidade celular foi determinada após 48 horas de incubação com os compostos através do ensaio de redução do MTT em cristais de formazan. A concentração citotóxica para 50% das células (IC_{50}) foi calculada, os valores de IC_{50} são apresentados na Tabela 12. Os ensaios também foram realizados com o metalo-fármaco cisplatina nas mesmas condições experimentais, como um composto de referência.

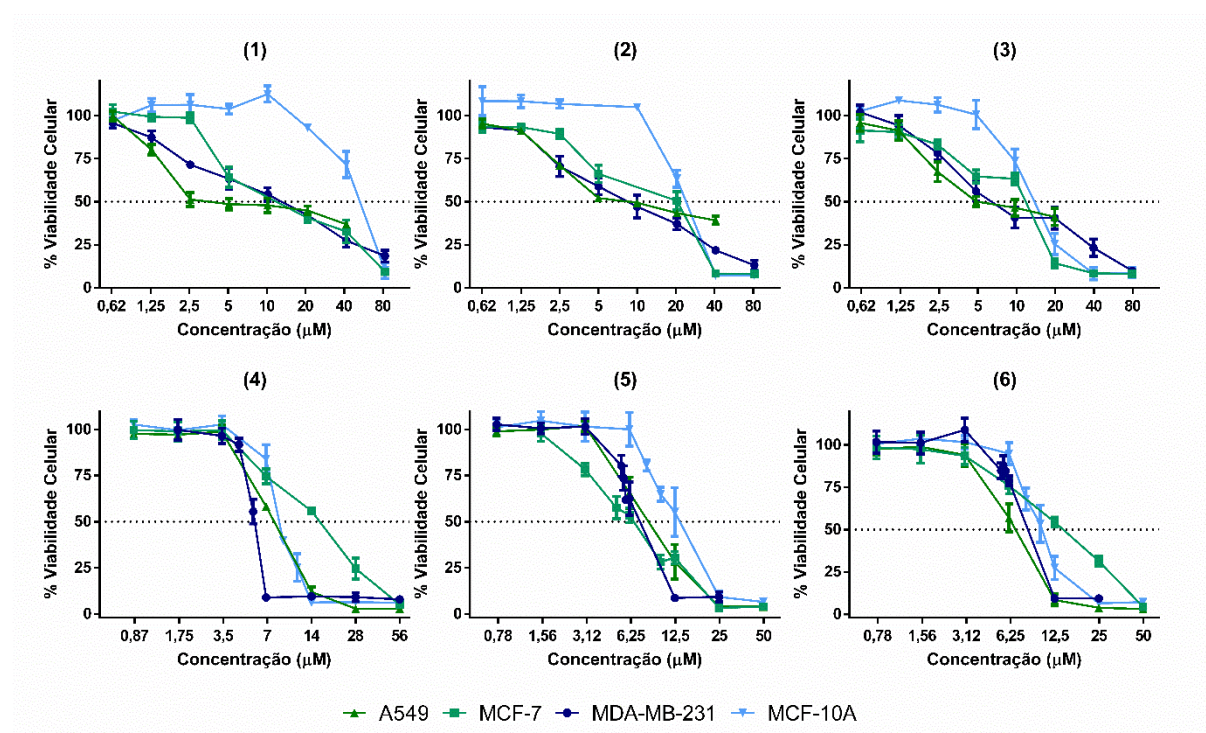


Figura 46 – Gráficos de viabilidade celular das linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231, A549 e MCF-10A, após 48 horas de incubação com os complexos de prata **1–6**. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicata. **Fonte:** Autor.

Tabela 12 - Atividade citotóxica dos complexos de prata (I) e ligantes tiossemicarbazonas. IC₅₀ (μM) dos compostos nas células A549, MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A após 48 h de incubação. ^aIS = Índice de seletividade: IC₅₀ MCF-10A/IC₅₀ MDA-MB-231. **Fonte:** Autor.

Composto	IC ₅₀ (μM)				^a IS
	A549	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A	
L1	>50	15,66 ± 3,61	6,49 ± 0,49	-	-
L2	>50	16,72 ± 0,98	5,02 ± 0,15	-	-
L3	>50	10,59 ± 2,41	4,93 ± 0,10	-	-
L4	>100	>100	>100	-	-
L5	>100	>100	>100	-	-
L6	>100	>100	>100	-	-
1	1,49 ± 0,10	13,19 ± 1,19	9,54 ± 0,38	48,55 ± 0,40	5,1
2	2,64 ± 0,10	20,90 ± 3,31	9,53 ± 1,36	21,19 ± 0,10	2,2
3	2,27 ± 0,16	11,07 ± 0,35	3,87 ± 0,33	12,00 ± 0,15	3,1
4	7,48 ± 0,21	16,63 ± 1,08	5,63 ± 0,13	8,39 ± 0,11	1,5
5	8,15 ± 1,21	5,78 ± 0,57	6,72 ± 0,46	11,61 ± 0,88	1,7
6	6,46 ± 0,51	18,80 ± 0,63	7,16 ± 0,10	9,53 ± 0,64	1,3
Cisplatina	23,36 ± 0,42	49,60 ± 3,69	43,85 ± 2,4	28,81 ± 5,84	0,6

Os ligantes tiossemicarbazonas L1–L3 apresentaram efeitos citotóxicos significativos contra as células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Esses resultados estão de acordo com a atividade antitumoral das tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas amplamente reportada na literatura, esses compostos são conhecidos como potentes inibidores da enzima ribonucleotídeo redutase (RR) (HEFFETER *et al.*, 2019). Por outro lado, os ligantes L1–L3 não foram ativos contra as células tumorais de pulmão A549, uma vez que apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 50 μM.

Os ligantes derivados da vanilina L4–L6 não foram ativos contra todas as células tumorais testadas, nenhuma resposta foi observada em concentrações até 100 μM.

Os compostos [Ag(phen)(L1-L3)](NO₃) **1–3** foram mais ativos do que o metalo-fármaco cisplatina contra todas as células tumorais testadas, com valores médios de IC₅₀ na faixa de 1,49 a 20,90 μM. Para as células MDA-MB-231, o complexo [Ag(phen)(L3)](NO₃) (**3**) (3,87 ± 0,33 μM) foi mais ativo do que [Ag(phen)(L1)](NO₃) (**1**) (9,54 ± 0,38 μM), demonstrando que a substituição do átomo de H em (**1**) no N(4) das tiossemicarbazonas pelo grupo etil (**3**) afeta a citotoxicidade dos compostos. Particularmente, o complexo **1** não foi apenas ativo contra as células de mama triplo negativo MDA-MB-231 (9,54 ± 0,38 μM) e hormônio-sensitivas MCF-7 (13,19 ± 1,19 μM), mas também menos citotóxico na linhagem não tumoral MCF-10A (48,55

$\pm 0,40 \mu\text{M}$). O índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão entre os valores de IC_{50} nas células MCF-10A e MDA-MB-231, o complexo **1** exibiu o maior índice de seletividade (IS = 5,1). Vale ressaltar que moléculas ativas com valores de $\text{IS} > 3,0$ são consideradas seletivas (CHELOPO *et al.*, 2013).

Os compostos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ **4–6** foram mais citotóxicos do que a cisplatina nas células tumorais MDA-MB-231, MCF-7 e A549, exibindo valores médios de IC_{50} na faixa de 5,63 a 18,80 μM . A citotoxicidade de **4–6** não foi afetada pela modificação da vanilina tiossemicarbazonas com porções N-etilmorfolina e N-etilpiperidina. Particularmente, o complexo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**) foi mais citotóxico nas células tumorais de mama triplo negativo MDA-MB-231 ($5,63 \pm 0,13 \mu\text{M}$) do que nas células hormônio-sensitivas MCF-7 ($16,63 \pm 1,08 \mu\text{M}$). Para efeito de comparação, o efeito citotóxico dos compostos **4–6** também foi avaliado na linhagem não tumoral MCF-10A. Os compostos **4–6** apresentaram IC_{50} moderadamente maiores para as células não tumorais em comparação as células MDA-MB-231, o complexo **5** foi o menos citotóxico nas células MCF-10A ($11,61 \pm 0,88 \mu\text{M}$). Os complexos de prata (I) exibiram índice de seletividade ($\text{IS} = 1,3 - 1,7$) maiores do que o metalofármaco cisplatina (0,6).

Em geral, todos os complexos de prata (I) planejados nesse trabalho foram ativos contra as células tumorais A549, MCF-7 e MDA-MB-231, exibindo IC_{50} da mesma ordem de micromolar. Por outro lado, os complexos derivados da trifenilfosfina $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ foram significativamente mais citotóxicos contra as células não tumorais MCF-10A do que os complexos derivados da 1,10-fenantrolina $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$. Logo, os compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ apresentaram maior seletividade para as células tumorais MDA-MB-231.

4.4.2 Quantificação celular de prata por GFAAS

A absorção celular desempenha um papel importante na bioatividade de um fármaco, em geral, a internalização e o acúmulo dos metalofármacos nas células tumorais são essenciais para seu efeito citotóxico. Visto que os complexos de prata (I) apresentaram promissora atividade citotóxica nas células de mama da linhagem tumoral MDA-MB-231, ensaios de acúmulo intracelular de prata foram realizados. As células foram expostas aos compostos **1–3** (50 μM) por 6 horas, e aos compostos **4–6** (12 μM) por 3 horas. A concentração de Ag foi

quantificada por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (HR-CS GFAAS). Os resultados estão apresentados na Figura 47.

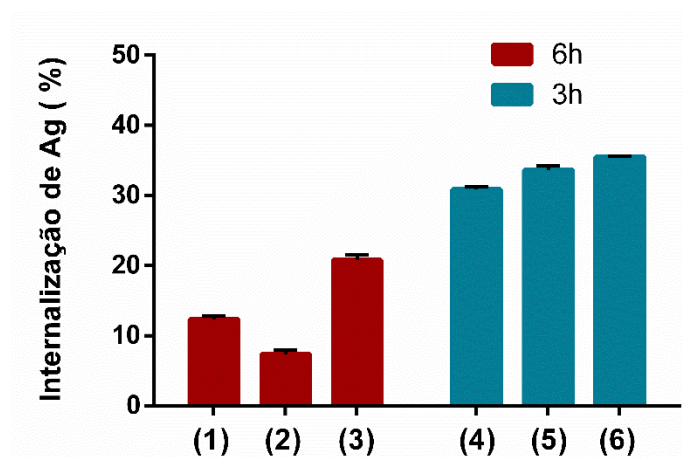


Figura 47 - Internalização de prata nas células tumorais MDA-MB-231. As células foram tratadas com os compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{TSC})]$ por 6 e 3 horas, respectivamente. A absorção celular de Ag foi quantificada por HR-CS GFAAS. **Fonte:** Autor.

A concentração de Ag das soluções utilizadas no tratamento das células também foi determinada (Apêndice 20). Com base na concentração inicial, a porcentagem de internalização de Ag foi calculada. Como mostrado na Figura 47, após 6 horas de incubação, 12% e 8% de $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (1) e $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L2})](\text{NO}_3)$ (2), respectivamente, adicionados ao meio de cultura foram internalizados pelas células MDA-MB-231. A maior internalização celular (20%) foi observada para o complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L3})](\text{NO}_3)$ (3), que também exibiu o menor IC_{50} nas células MDA-MB-231, demonstrando que a substituição do átomo de H em (1) no N(4) das tiossemicarbazonas pelo grupo etil (3) aumenta a taxa de internalização dos compostos. Esses resultados estão de acordo com trabalhos reportados na literatura, em que os complexos metálicos citotóxicos mais potentes são internalizados e acumulados mais eficientemente pelas células (SCHEFFLER, 2010; REDDY, 2018b). Os resultados de quantificação celular de Ag para os compostos 1–3 apresentaram uma correlação com a citotoxicidade *in vitro*, sugerindo que os efeitos citotóxicos nas células MDA-MB-231 dependem da internalização dos compostos.

Para os complexos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ 4–6, cerca de 30% dos compostos adicionados no meio de cultura foram internalizados nas células MDA-MB-231 após 3 horas de incubação. Consistentemente, os resultados de quantificação celular de Ag estão de acordo com a atividade citotóxica *in vitro* dos compostos. Estes resultados demonstraram que a modificação da vanilina

tiosemicarbazonas com porções N-etilmorfolina e N-etilpiperidina não aumentou seus efeitos citotóxicos nem a internalização celular.

Em geral, os resultados de quantificação celular mostraram que os complexos derivados da trifetilfosfina $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ são internalizados nas células MDA-MB-231 de forma mais eficiente do que os complexos derivados da 1,10-fenantrolina $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$. Esses dados concordam bem com observações anteriores de que a natureza lipofílica dos ligantes PPh_3 desempenha um papel importante na passagem através da membrana celular, aumentando a internalização celular dos complexos metálicos (CARLOS LIMA; RODRIGUEZ, 2011).

Com base nos resultados de citotoxicidade *in vitro*, um composto representativo de cada família de complexos foi selecionado para investigar seus efeitos citotóxicos e apoptóticos nas células tumorais de mama triplo negativo MDA-MB-231 e interação com o ctDNA. O complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (1) foi o escolhido da família $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$, já que apresentou o maior índice de seletividade (IS). Por outro lado, os compostos da família $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ apresentaram IS muito próximos, assim o complexo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (4) foi selecionado.

4.4.3 Ensaios de interação com o ctDNA

O DNA é o alvo biológico principal dos estudos com complexos metálicos, e o tipo de interação com esse alvo depende da natureza do íon metálico e das características dos ligantes. Vários complexos metálicos são conhecidos por induzir seus efeitos citotóxicos através da interação com o DNA (ZAKI; ARJMAND; TABASSUM, 2016).

A estrutura do B-DNA, a forma biologicamente predominante, compreende duas fitas antiparalelas de DNA que formam uma dupla hélice “da mão direita”. As bases nitrogenadas ficam no centro da hélice e ligações de hidrogênio entre adenina e timina (A–T) e guanina e citosina (G–C) as mantêm unidas. Essa estrutura é mantida por interações de empilhamento que orientam os pares de base perpendicularmente ao eixo helicoidal. A orientação das ligações no DNA faz com que se formem dois sulcos, o maior e o menor, estes sulcos são sítios para a ligação de moléculas pequenas (PAGES *et al.*, 2015). Em geral, os compostos podem interagir com o DNA através de ligações covalentes e não-covalentes, Figura 48. Os principais modos de interações não-covalentes são intercalação, interações nos sulcos e interações eletrostáticas.

A interação entre moléculas pequenas e o DNA pode ser estudada através de vários métodos e técnicas. Estes ensaios de ligação com o DNA são sistematicamente realizados na pesquisa de novos metalo-fármacos (REHMAN, 2015; KELLETT, 2019). Para avaliar a afinidade dos complexos de prata elo DNA, ensaios de ligação com o ctDNA foram realizados com os complexos **1** e **4**. O ctDNA (*calf thymus*) é extensivamente utilizado como representante do B-DNA.

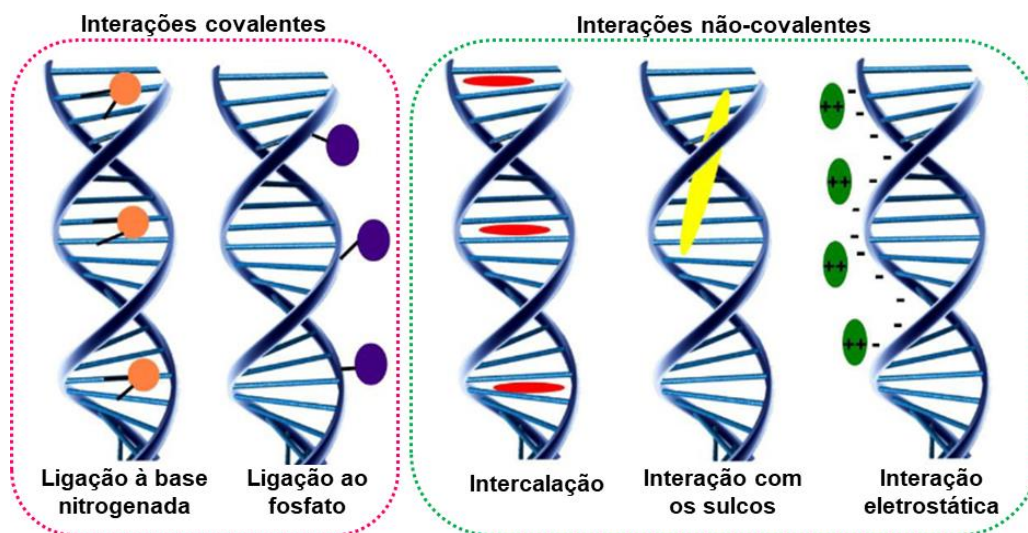


Figura 48 - Representação dos tipos de interação com o DNA. **Fonte:** Adaptado de BARRA; NETTO, 2015.

A espectroscopia eletrônica de absorção é frequentemente empregada no estudo da interação entre o DNA e complexos metálicos. O espectro de absorção na região do UV-Vis do ctDNA exibe uma banda intensa em 260 nm. A interação entre o ctDNA e complexos metálicos pode ser monitorada através de mudanças no espectro de UV-Vis do composto após a adição de concentrações crescentes do ctDNA. De modo que, alterações na intensidade e posição das bandas são consideradas decorrentes da formação de um aduto entre o ctDNA e o composto. Em geral, quando ocorre a intercalação de uma molécula com o DNA observa-se um significativo hipocromismo e desvio batocrômico no máximo de absorção em comparação ao complexo livre. Por outro lado, compostos que interagem fracamente com o DNA mostram pouco efeito hipocrômico.

Os espectros de UV-Vis dos compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (**1**) e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**) foram registrados na ausência e presença de concentrações crescentes do ctDNA (0 – 60 μM), Figura 49.

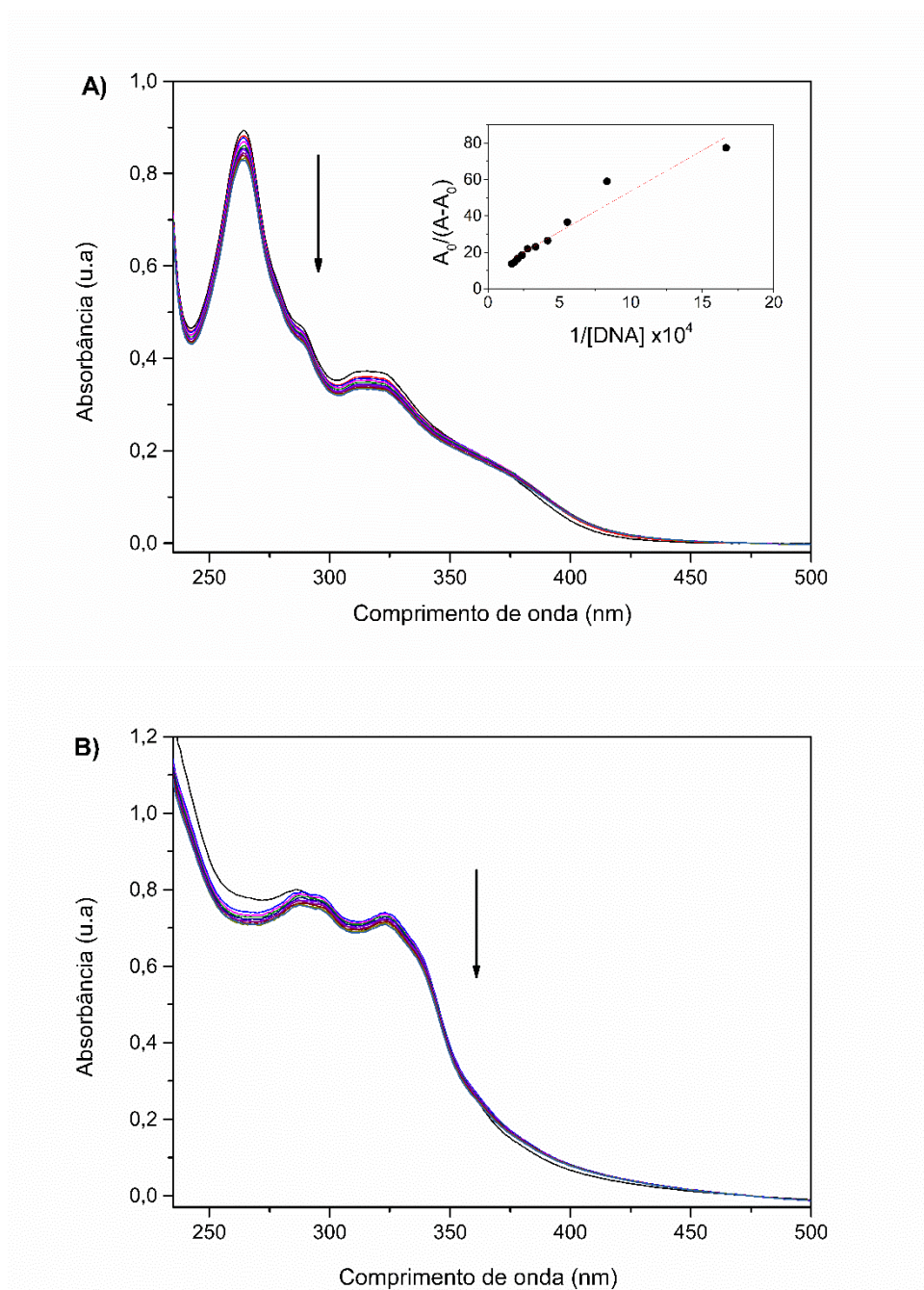


Figura 49 - Espectros de UV-Vis dos compostos **1** (A) e **4** (B) em tampão tris-HCl (pH 7,4) na presença de quantidades crescentes de ctDNA. [complexo] = 20 μ M; [ctDNA] = 0 – 60 μ M. Gráfico inserido: $1/[DNA]$ vs. $A_0/(A-A_0)$. **Fonte:** Autor.

Após a adição do ctDNA a solução do complexo $[Ag(phen)(L1)](NO_3)$ (**1**) observou-se uma diminuição de aproximadamente 8% da intensidade da absorbância (hipocromismo) sem desvio significativo da banda em 264 nm. A constante intrínseca de ligação (K_b) foi calculada de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand. A constante K_b encontrada para o composto **1** considerando as mudanças em 264 nm foi $2,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. O valor de K_b é significativamente menor em comparação aos valores reportados para o brometo de etídio ($4,94 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) e

metalo-intercaladores clássicos ($10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$) (BOGER, 2001; WHEATE, 2007), sugerindo que **1** é capaz de interagir fracamente com o ctDNA.

A adição do ctDNA ao complexo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**) causou um efeito hipocrômico na banda em 288 nm, porém, a taxa de hipocromismo foi menor que 5%. Logo, não foi possível determinar o valor da constante K_b , evidenciando a existência de interações fracas entre o composto **4** e o ctDNA.

Para obter mais evidências da interação entre os complexos de prata com o ctDNA, experimentos de dicroísmo circular (CD) e ensaios de ligação competitiva foram realizados.

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica muito sensível para analisar mudanças conformacionais decorrentes da ligação de moléculas pequenas com o DNA. O espectro de CD do DNA na forma B exibe duas bandas típicas na região do UV, uma banda negativa em 245 nm e uma banda positiva em 275 nm, atribuídas à sua helicidade e empilhamento das nucleobases, respectivamente (KELLETT *et al.*, 2019). Em geral, interações eletrostáticas ou nos sulcos induzem pequenas ou nenhuma alterações espectrais, enquanto que a intercalação ao DNA causa mudanças significativas na intensidade das duas bandas (REHMAN *et al.*, 2015). Os espectros de CD do ctDNA na ausência e presença dos compostos **1** e **4** foram registrados, Figura 50. Como pode ser observado, os complexos não causaram alterações significativas nos espectros de CD do ctDNA, demonstrando que a estrutura do B-DNA é mantida quando os complexos interagem com a biomolécula. Também não foram observados novos sinais, esses resultados sugerem que os compostos **1** e **4** podem interagir com o ctDNA através de ligações nos sulcos ou interações eletrostáticas.

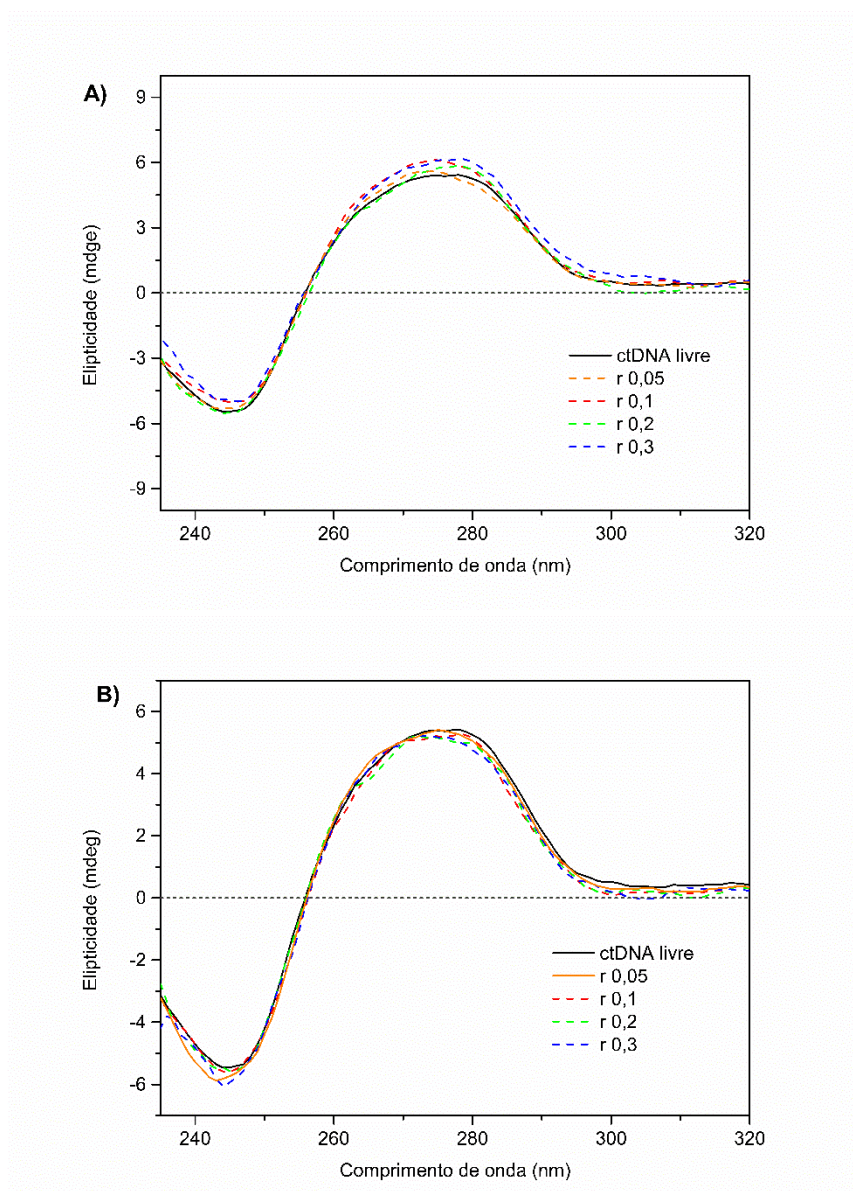


Figura 50 - Espectros de CD do ctDNA livre e na presença dos compostos **1** (A) e **4** (B) em tampão tris-HCl (pH 7,4). [ctDNA] = 50 μ M. $r = [\text{complexo}] / [\text{DNA}]$. **Fonte:** Autor.

Os ensaios de ligação competitiva fornecem evidências indiretas sobre o modo de ligação ao DNA. Estudos de ligação competitiva com o Hoechst 33258 foram realizados para os compostos **1** e **4**. Hoechst 33258 liga-se ao sulco menor do DNA e exibe uma intensa fluorescência quando ligado ao DNA. Após a ligação ao DNA, a fluorescência do Hoechst aumenta aproximadamente 30 vezes (BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITIS, 2018). Em razão disso, Hoechst 33258 é frequentemente utilizado como uma sonda de ligação ao sulco menor do DNA, Figura 51. Este ensaio é empregado para analisar se o composto pode se ligar ao DNA e deslocar o Hoechst 33258 através da supressão da fluorescência do aduto

Hoechst-DNA. Dessa forma, a fluorescência do aduto Hoechst-DNA é analisada na ausência e presença do composto em estudo.

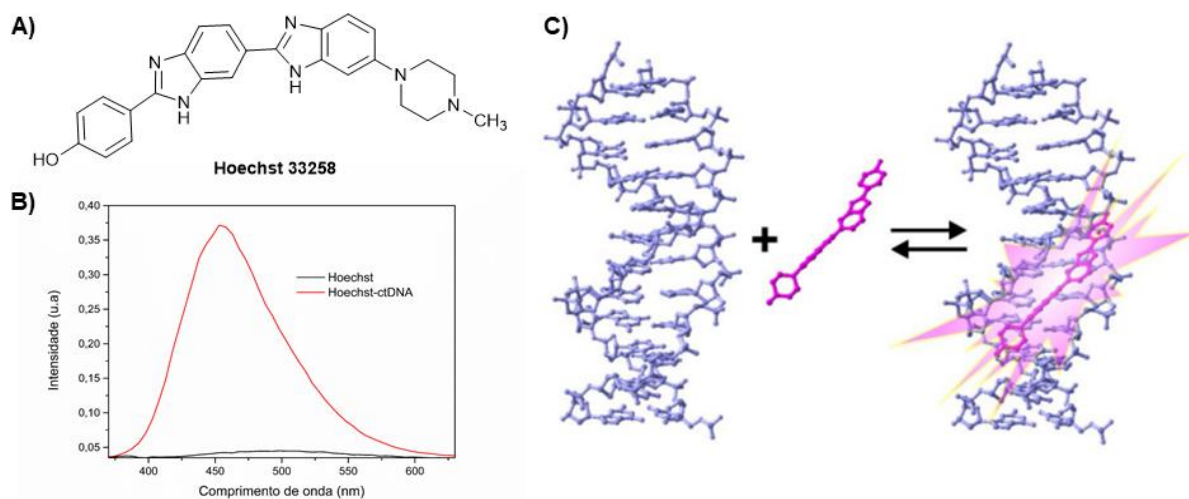


Figura 51 – **A)** Estrutura do Hoechst 33258; **B)** Espectro de emissão do Hoechst livre e do aduto Hoechst-ctDNA em tampão Tris-HCl; **C)** Representação da ligação do Hoechst 33258 ao sulco menor do B-DNA. **Fonte:** Adaptado de BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITE, 2018.

Os espectros de emissão do aduto Hoechst-ctDNA na presença de concentrações crescentes dos compostos **1** e **4** são apresentados na Figura 52. Como pode ser observado, a intensidade de emissão do Hoechst-ctDNA em 458 nm diminuiu aproximadamente 70% após a adição dos complexos de prata, evidenciando que os compostos podem se ligar ao ctDNA e deslocar o Hoechst 33258 do sulco menor. Embora o deslocamento do Hoechst 33258 seja normalmente atribuído a ligação competitiva com o sulco menor, o Hoechst 33258 também pode ser deslocado por agentes que se ligam a outras regiões do DNA como observado por Peberdy *et al.* (2007). Nossos resultados demonstram que os complexos **1** e **4** podem deslocar o Hoechst 33258, porém, a ligação entre os complexos e o ctDNA é mais fraca, já que mesmo na presença de um excesso dos compostos de prata, a fluorescência do aduto Hoechst-ctDNA não é completamente extinta.

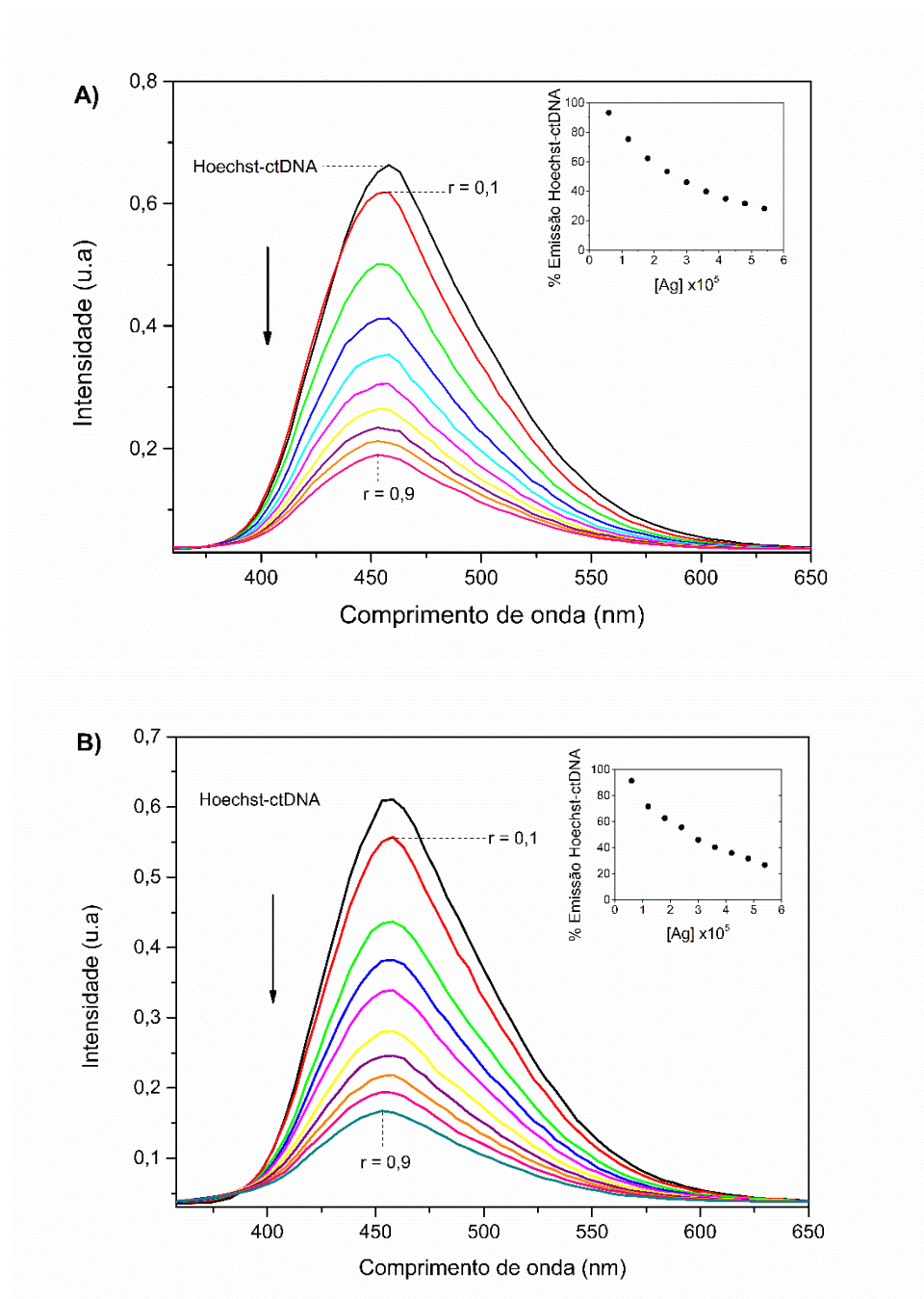


Figura 52 - Espectro de emissão do complexo Hoechst-ctDNA ($\lambda_{ex} = 350$ nm) na presença dos compostos **1** (A) e **4** (B) (6 – 60 μ M) em tampão tris-HCl (pH 7,4). [DNA] = 60 μ M; [TO] = 6 μ M. Gráfico inserido: [complexo] vs porcentagem de emissão do complexo Hoechst-ctDNA.

Em virtude da natureza intercalante do ligante 1,10-fenantrolina, o ensaio de ligação competitiva com o Tiazol Orange (TO) foi realizado com o complexo $[Ag(phen)(L1)](NO_3)$ (**1**). Este ensaio é utilizado para analisar a capacidade de um composto em deslocar o TO intercalado através da supressão da fluorescência do aduto TO-DNA. Tiazol Orange é um corante fracamente fluorescente quando livre em solução, mas a fluorescência do TO aumenta intensamente após a intercalação ao DNA. Essa propriedade torna o TO uma excelente sonda

de intercalação, Figura 53. Para isso, a fluorescência do aduto TO-DNA é monitorada na ausência e presença do composto em estudo (BOGER; TSE, 2001).

Os espectros de emissão do aduto TO-ctDNA na presença de concentrações crescentes do complexo **1** são apresentados na Figura 54. A intensidade de emissão do aduto TO-ctDNA não mudou significativamente após a adição do composto de prata, demonstrando que **1** não foi capaz de deslocar a sonda TO. Portanto, esses resultados evidenciam que o composto **1** não interage com o ctDNA por intercalação.

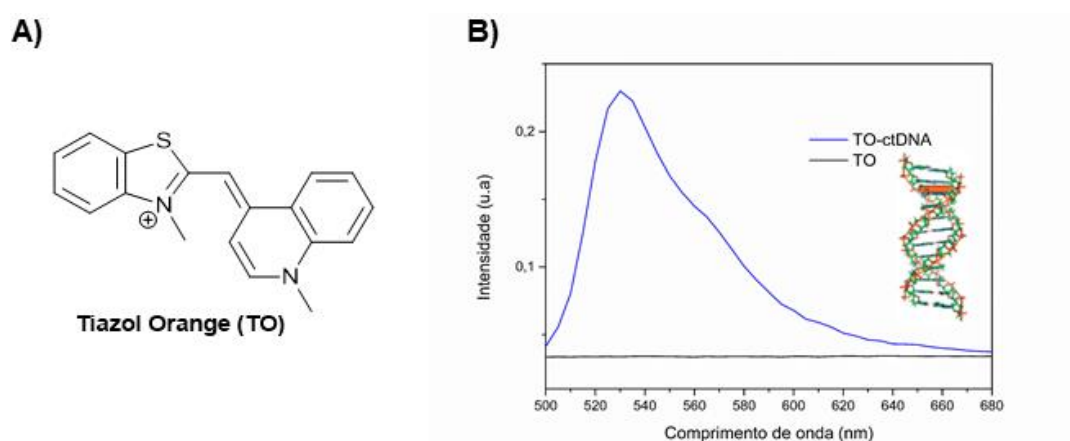


Figura 53 – A) Estrutura do Tiazol Orange (TO); **B)** Espectro de emissão do TO livre em solução e do aduto TO-ctDNA em tampão Tris-HCl. **Fonte:** Autor.

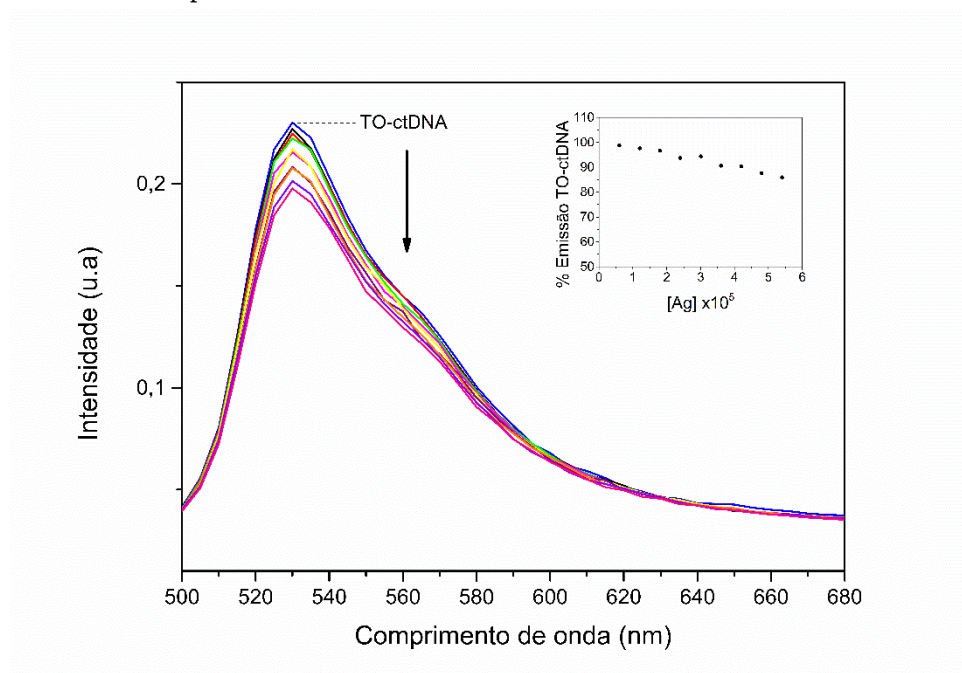


Figura 54 - Espectro de emissão do complexo TO-ctDNA ($\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm) na presença do composto **1** (6 – 60 μM) em tampão tris-HCl (pH 7,4). [DNA] = 60 μM ; [TO] = 6 μM . Gráfico inserido: [complexo] vs porcentagem de emissão do complexo TO-ctDNA.

4.4.4 Análise da morfologia celular

A morte celular pode ser analisada através de alterações morfológicas nas células após o tratamento com um composto citotóxico. A morfologia celular das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foi examinada após o tratamento com 5, 10 e 20 μM do complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (**1**) por 48 horas. As imagens foram registradas e são apresentadas na Figura 55. Para as células MDA-MB-231, após o tratamento com o complexo **1** foram observadas alterações morfológicas em comparação ao controle negativo (células não tratadas), incluindo diminuição no número de células, encolhimento celular e as células exibiram formato circular. Essas alterações são evidências de morte celular. Por outro lado, o tratamento com o complexo **1** nas mesmas concentrações resultou em pequenas alterações na morfologia das células MCF-10A, demonstrando que o composto é mais citotóxico contra as células MDA-MB-231. Esses resultados estão de acordo com os dados de IC_{50} nas duas linhagens celulares.

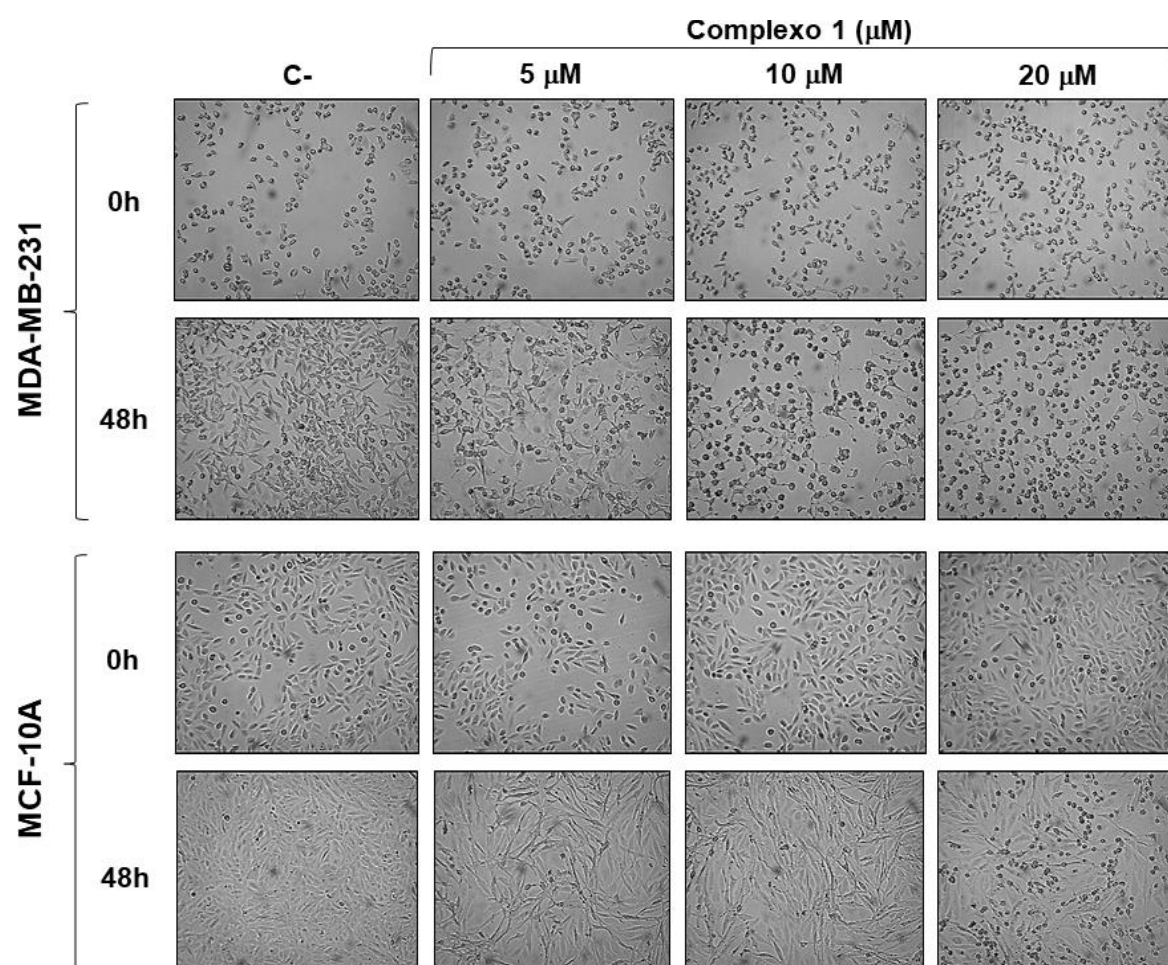


Figura 55 - Efeitos citotóxicos do complexo **1**. Morfologia celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A analisada após 48h de tratamento com diferentes concentrações de **1**. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor.

O efeito citotóxico do complexo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**) foi avaliado nas células MDA-MB-231, a morfologia celular foi examinada após o tratamento com 6, 12 e 24 μM do complexo **4** por um período de 48 horas. As imagens foram registradas após 24 h e 48 h de incubação. Como mostrado na Figura 56, as células não tratadas (C-) exibiram morfologia normal. Por outro lado, as células MDA-MB-231 tratadas com o complexo **4** também apresentaram características morfológicas típicas de morte celular. Tais alterações morfológicas foram dependentes da concentração e do tempo. Em geral, as células MDA-MB-231 tratadas exibiram uma diminuição significativa da densidade celular. Em 24 h, o tratamento com 12 e 24 μM induziu o aparecimento de células encolhidas e com formato circular. E após 48 h, essas alterações foram observadas para todas as concentrações testadas. Além disso, o complexo **4** também induziu a desaderência das células da placa.

As alterações morfológicas induzidas pelos compostos **1** e **4** nas células tumorais MDA-MB-231 são associadas a apoptose celular.

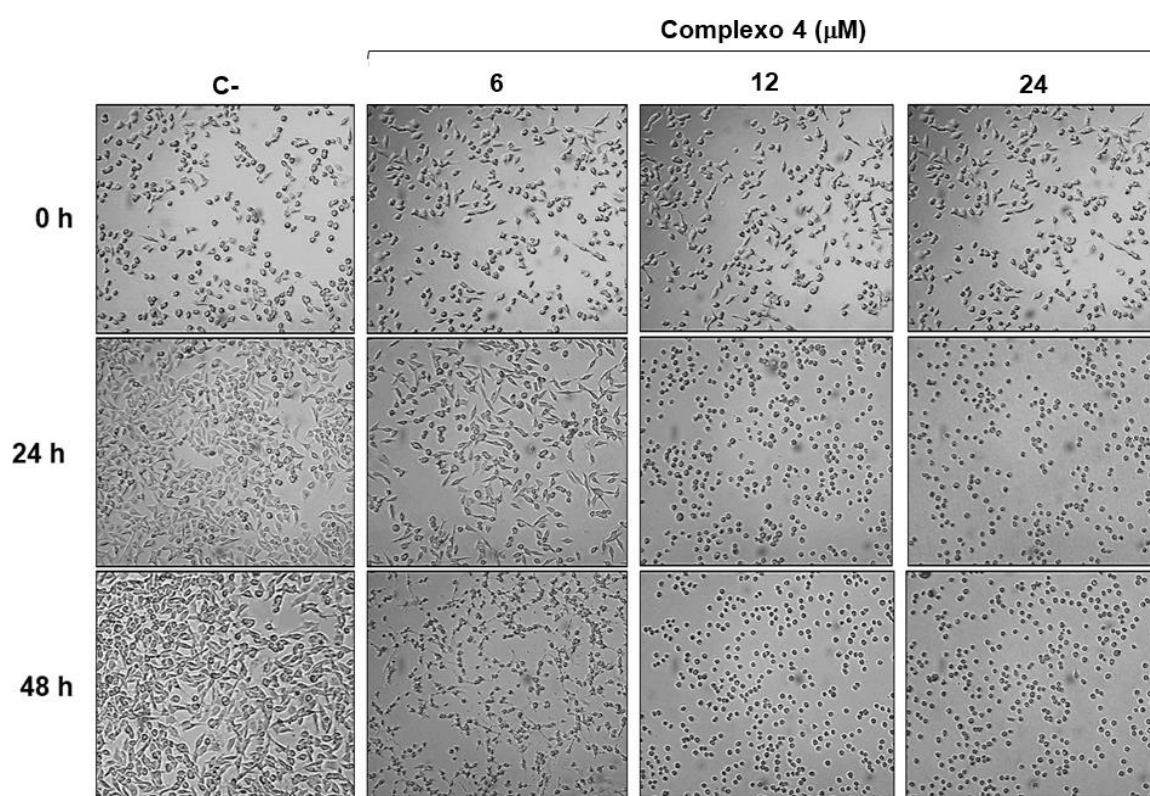


Figura 56 - Efeitos citotóxicos do complexo **4**. Morfologia celular das células MDA-MB-231 analisada após 24h e 48h de tratamento com diferentes concentrações de **4**. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor.

4.4.5 Análise do ciclo celular

O ciclo celular é um conjunto de eventos coordenados em que ocorre a divisão celular. O ciclo celular consiste em duas principais fases, a intérfase e a mitose. A intérfase precede a divisão celular e é dividida em três fases: fase G1 (“Gap 1”), S (Síntese) e G2 (“Gap 2”). Os cromossomos são replicados na fase S (síntese de DNA) e segregados em duas células filhas geneticamente idênticas na fase M (mitose). As fases G1 e G2 representam períodos em que as células se preparam para as fases S e M, respectivamente. Para garantir a progressão ordenada de G1 para S e de G2 para M, as células apresentam pontos de checagem (*checkpoints*) que impedem a transição para a próxima fase até que a anterior seja completamente concluída. Os pontos de checagem são ativados quando danos celulares são detectados e induzem a parada do ciclo celular até que o dano seja reparado e, caso seja irreparável, levam as células a apoptose. Neste contexto, compostos que induzem a parada do ciclo celular demonstram ser promissores para terapia do câncer (VERMEULEN, 2003; DICKSON, 2009; DIAZ-MORALLI, 2013).

O conteúdo de DNA das células MDA-MB-231 foi analisado por citometria de fluxo usando coloração com iodeto de propídeo (PI). PI é um composto que se liga de forma estequiométrica aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência proporcional a quantidade de DNA da célula. Esse método permite examinar a distribuição do ciclo celular e identificar a população de células que apresentam DNA fragmentado, uma característica típica de células apoptóticas. Quando células em apoptose são coradas com PI e analisadas por citometria de fluxo no canal de fluorescência FL2, exibem um pico correspondente à fração hipodiploide (sub-G1) (RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

O ensaio de coloração com PI é baseado na quantificação de DNA no interior das células. Os histogramas são caracterizados pelas frações sub-G1, G1, S e G2/M. As células na fase G2/M do ciclo têm o dobro da quantidade de DNA do que as células na fase G1. As células nas fases G2 e M possuem o conteúdo de DNA idêntico, logo, não podem ser separadas. Já as células em apoptose apresentam menor intensidade de fluorescência já que o DNA encontra-se fragmentado.

O efeito do complexo [Ag(phen)(L1)](NO₃) (**1**) sobre a distribuição do ciclo celular das células MDA-MB-231 foi investigado. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com 10 µM de **1** por 48 horas é apresentada na Figura 57. O tratamento com o complexo **1** induziu um aumento significativo de células na fração sub-G1. No controle negativo (células não tratadas), as células MDA-MB-231 foram caracterizadas por frações de

5,8% em sub-G1, 69,5% em G1, 11,5% em S e 13,0% em G2/M do ciclo celular. Após o tratamento com **1**, foi observado um aumento na porcentagem de células em sub-G1 para 26,5%, demonstrando que o complexo **1** induziu a fragmentação do DNA nas células MDA-MB-231, uma característica da apoptose celular. Além disso, o complexo **1** também induziu mudanças nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular, 60,6% de células na fase G1 e 6,4% de células na fase S e G2/M.

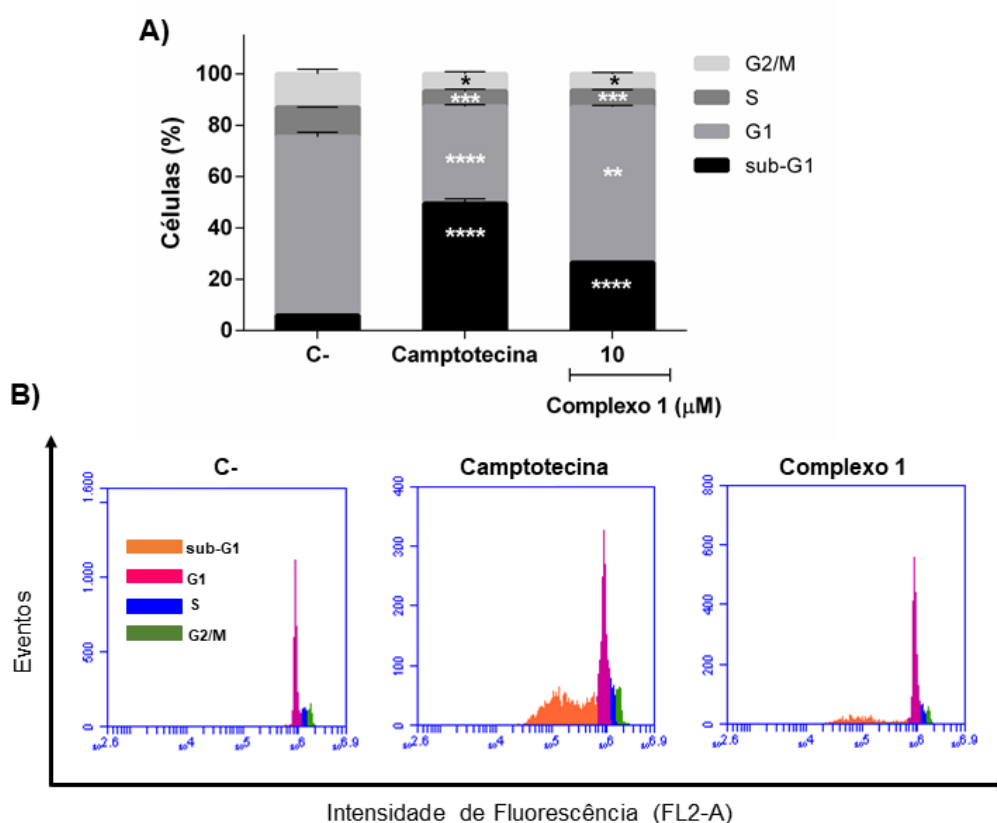


Figura 57 - Análise do ciclo celular das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **1**. **A)** Gráfico representativo da porcentagem de células em diferentes frações (Sub G1, G1, S e G2/M) após o tratamento com 10 µM de **1** e 40 µM de camptotecina por 48 horas. **B)** Histogramas representativos do ciclo celular com marcação com iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A). O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor.

O ensaio de ciclo celular também foi realizado com o complexo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**), as células MDA-MB-231 foram tratadas com 6 µM de **4** por 48 horas. A porcentagem de células em cada fase é mostrada na Figura 58. Assim como observado para o complexo **1**, o complexo **4** induziu a fragmentação do DNA, evidenciada pelo aumento da população de células na fração sub-G1. A porcentagem de células na fração sub-G1 no controle negativo (5,5%) aumentou para 23,3% após o tratamento. Simultaneamente, uma diminuição significativa na população

de células em G1 de 70,4% (controle negativo) para 43%, e um aumento na população de células em S de 10,9% (controle negativo) para 15% também foram observadas nas células MDA-MB-231 tratadas com o complexo 4. O ensaio também foi realizado com a camptotecina, um quimioterápico indutor de apoptose (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992), nas mesmas condições experimentais. O tratamento com 20 μ M de camptotecina induziu o aumento da população de células na fração sub-G1 para 60,6% e uma diminuição de células em G1 e S para 31,1 e 3,7%, respectivamente.

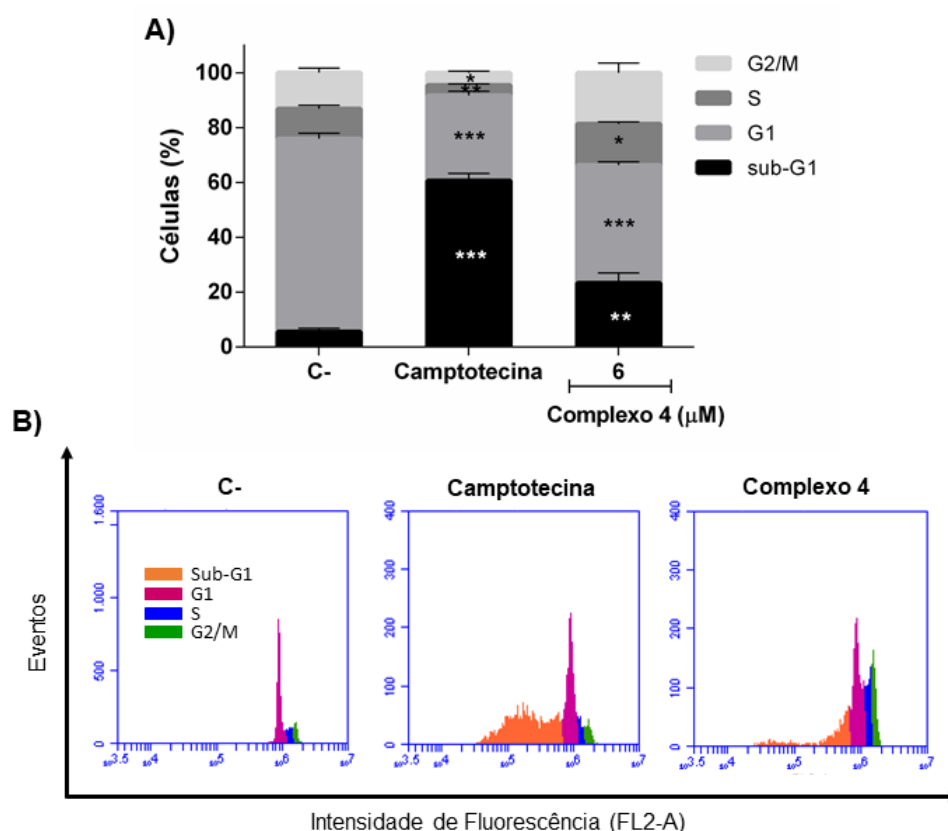


Figura 58 - Análise do ciclo celular das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo 4. **A)** Gráfico representativo da porcentagem de células em diferentes frações (Sub G1, G1, S e G2/M) após o tratamento com 6 μ M de 4 e 20 μ M de camptotecina por 48 horas. **B)** Histogramas representativos do ciclo celular com marcação com iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A). O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$ e *** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor.

4.4.6 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A apoptose pode ser iniciada a partir de duas principais vias de sinalização, via extrínseca ou via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é ativada pela ligação de ligantes específicos a receptores de morte celular de superfície. Por outro lado, a via intrínseca é ativada por uma variedade de sinais intracelulares ou extracelulares como agentes citotóxicos, estresse celular, radiação, privação de fatores de crescimento entre outros. Como resposta a esses sinais, alterações mitocondriais são induzidas, como a permeabilização da membrana mitocondrial e perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A permeabilização da membrana mitocondrial permite a liberação de proteínas para o citoplasma que desencadeiam a apoptose celular (OUYANG *et al.*, 2012).

A perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é uma das principais alterações que ocorrem nos estágios iniciais da apoptose. Logo, a análise do $\Delta\Psi_m$ fornece informações sobre a atividade mitocondrial. Mudanças no $\Delta\Psi_m$ podem ser examinadas usando corantes catiônicos fluorescentes. O JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) é um corante catiônico lipofílico (fluorescência na região do verde), permeável à membrana mitocondrial que se acumula e forma agregados na matriz mitocondrial. Esses agregados de JC-1 exibem emissão na região do vermelho, portanto, distintivamente dos monômeros de JC-1 que emitem na região do verde. Em células saudáveis com $\Delta\Psi_m$ normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial permite que o corante JC-1 se acumule no interior da mitocôndria, e forme os agregados. Por outro lado, em células apoptóticas, a matriz mitocondrial é menos negativa devido a permeabilização da membrana mitocondrial e perda do $\Delta\Psi_m$. Assim, JC-1 não atinge uma concentração suficiente para a formação dos agregados, Figura 59 (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019).

A análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células MDA-MB-231 foi realizada por citometria de fluxo usando o corante JC-1. Os gráficos *Dot plots* representam os parâmetros de intensidade de fluorescência verde (FL-1) e vermelha (FL-2). As células com $\Delta\Psi_m$ normal estão representadas em vermelho, enquanto que as células com $\Delta\Psi_m$ alterado são mostradas em verde. A despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi analisada a partir da população de células com emissão de fluorescência verde. Como mostrado nas Figura 58 e 59, as células do controle negativo (não tratadas) emitiram predominantemente fluorescência vermelha, evidenciando a formação dos agregados de JC-1.

O efeito do complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (**1**) no $\Delta\Psi_m$ das células MDA-MB-231 foi analisado após o tratamento com 10, 20 e 40 μM de **1** por 4 horas, Figura 60. O tratamento com 10 e 20 μM de **1** não induziu alterações no $\Delta\Psi_m$ nessas condições. Por outro lado, a população de células com emissão de fluorescência verde aumentou para 15,6% após o tratamento com 40 μM de **1**, indicando a perda de $\Delta\Psi_m$ das células MDA-MB-231 nos estágios iniciais da apoptose.

O ensaio do potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ também foi realizado com o complexo $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**), as células MDA-MB-231 foram tratadas com 6, 12 e 24 μM de **4** por 4 horas (Figura 61). A população de células com fluorescência vermelha diminuiu significativamente após o tratamento com o complexo **4** em comparação as células do controle negativo, sugerindo a despolarização do potencial de membrana mitocondrial de maneira dependente da concentração. Em 4 horas de tratamento com 24 μM de **4**, a porcentagem de células com fluorescência verde aumentou para 47%, em comparação com 2,1% de células no controle negativo. O ensaio também foi realizado com a cisplatina nas mesmas condições experimentais. O tratamento com 50 μM de cisplatina por 4 horas não afetou o $\Delta\Psi_m$ das células MDA-MB-231.

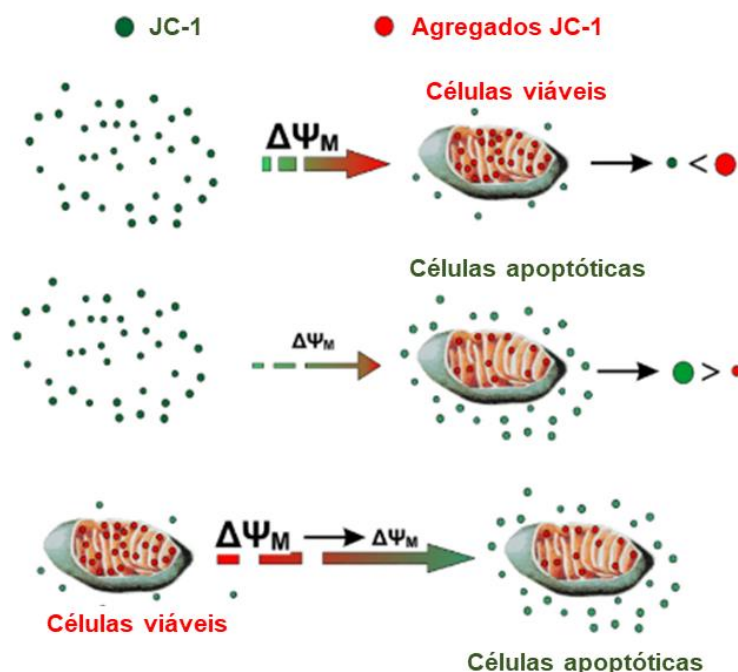


Figura 59 - Esquema representativo do corante JC-1 na mitocôndria. Em células viáveis com $\Delta\Psi_m$ normal, ocorre a formação dos agregados de JC-1. Após a despolarização de $\Delta\Psi_m$, JC-1 permanece na forma de monômeros. **Fonte:** Adaptado de SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019.

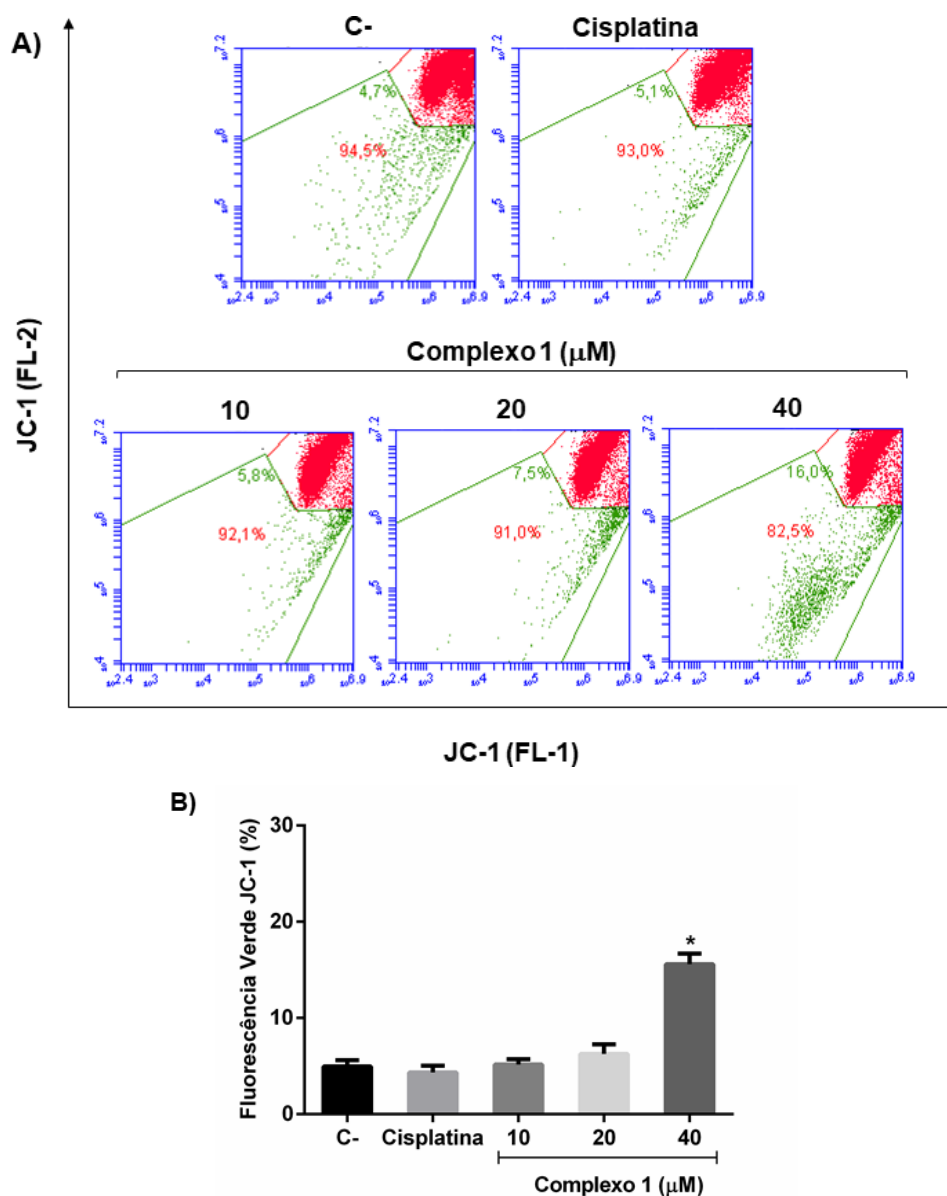


Figura 60 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo **1** por 4 horas, marcação com JC-1. As células com membranas mitocondriais intactas são representadas em vermelho, enquanto as células com perda de $\Delta\Psi_m$ são mostradas em verde **A)** Dot plots representativos das células após o tratamento com 10, 20 e 40 μM de **1** e 50 μM de cisplatina. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células com fluorescência verde. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor.

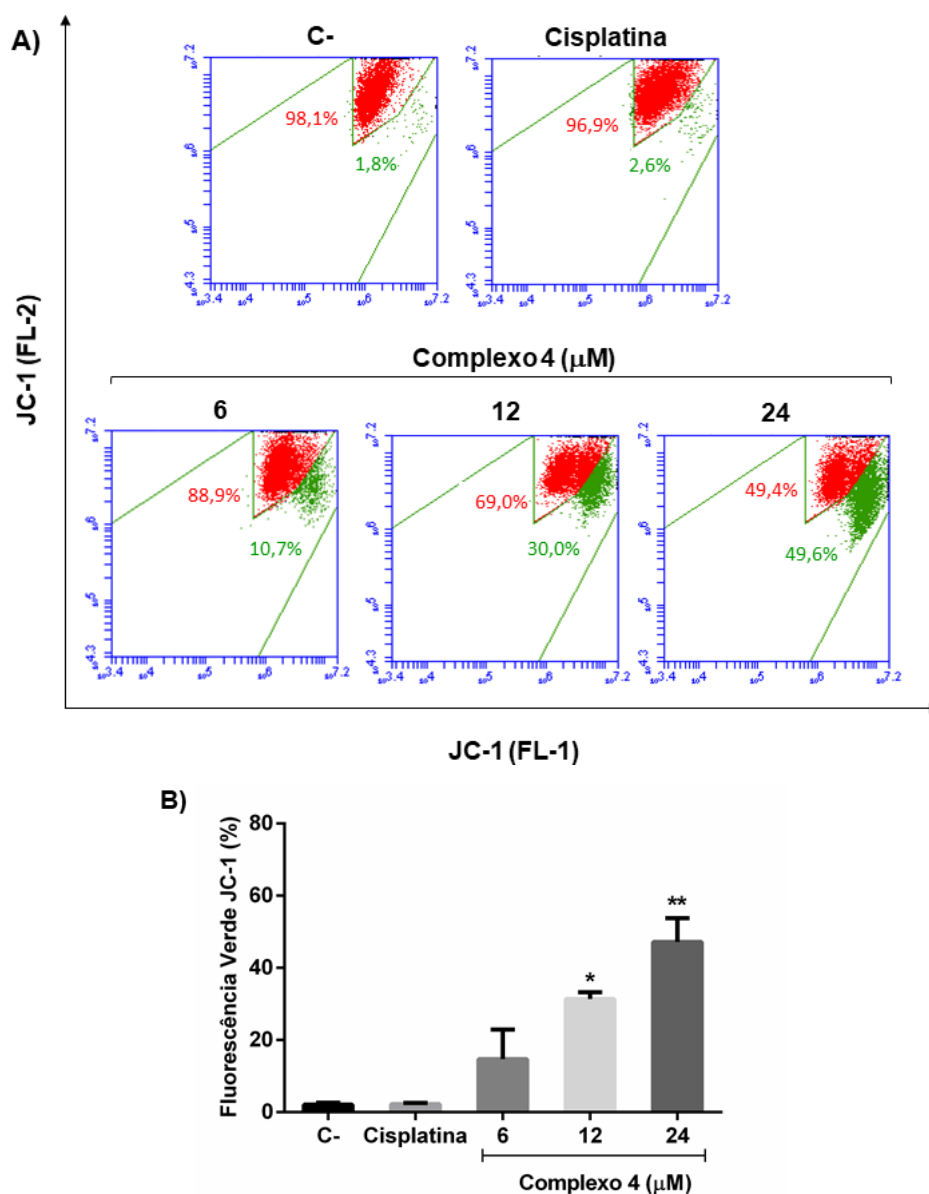


Figura 61 - Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo 4 por 4 horas, marcação com JC-1. As células com membranas mitocondriais intactas são representadas em vermelho, enquanto as células com perda de $\Delta\Psi_m$ são mostradas em verde **A)** Dot plots representativos das células após o tratamento com 6, 12 e 24 μM de 4 e 50 μM de cisplatina. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células com fluorescência verde. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor.

4.4.7 *Análise da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)*

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas, em concentrações normais estão envolvidas em processos fisiológicos como na proliferação e diferenciação celular. Entretanto, em excesso causam danos a ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, membranas e organelas, que podem desencadear a morte celular via apoptose (REDZADUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

Vários métodos são empregados para examinar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, as técnicas mais diretas utilizam sondas fluorescentes ou quimioluminescentes permeáveis a membrana celular. A sonda H₂DCFDA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) é geralmente utilizada para analisar de forma direta o estado redox intracelular. Após a difusão para o meio intracelular, H₂DCFDA é desacetilado pela ação de esterases intracelulares a um composto não fluorescente, que na presença de ROS é oxidado em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto com fluorescência intensa. O composto DCF pode ser monitorado por várias técnicas baseadas em fluorescência, como microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (ZHANG; DAI; YUAN, 2018).

Para analisar se os complexos de prata (I) são capazes de induzir um aumento nos níveis de ROS intracelular, as células MDA-MB-231 foram marcadas com a sonda H₂DCFDA e examinadas por microscopia de fluorescência confocal. Como mostrado nas Figura 60 e 61, as células do controle negativo (não tratadas) não exibiram fluorescência verde significativa, evidenciando um baixo nível de ROS intracelular.

O tratamento com 5, 10 e 20 µM do complexo [Ag(phen)(L1)](NO₃) (**1**) por 24 e 48 horas induziu a geração de ROS intracelular nas células MDA-MB-231, o que é demonstrado pelo aumento da fluorescência verde nas células tratadas em relação ao controle negativo (Figura 62). As células tratadas com cisplatina (50 µM) também exibiram fluorescência verde mais intensa.

A geração de ROS intracelular também foi analisada nas células MDA-MB-231 após o tratamento com 6 e 12 µM do complexo [AgCl(PPh₃)₂(L4)] (**4**) por 24 horas (Figura 63). Após o tratamento com **4**, também foi observado um aumento da fluorescência verde em comparação com as células do controle negativo, demonstrando que o complexo **4** induz a formação de ROS intracelular nas células MDA-MB-231. Nas mesmas condições experimentais, foi observado um aumento da fluorescência verde nas células tratadas com cisplatina (50 µM).

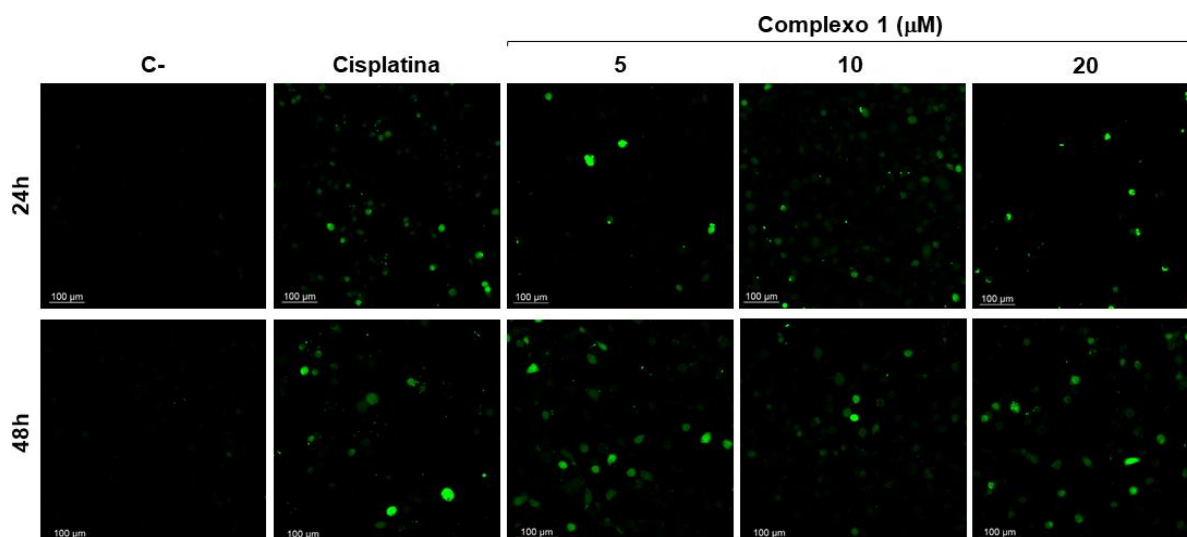


Figura 62 - Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo 1 (5, 10 e 20 μM) e 50 μM de cisplatina por 24 e 48 horas, marcação com H_2DCFDA . Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor.

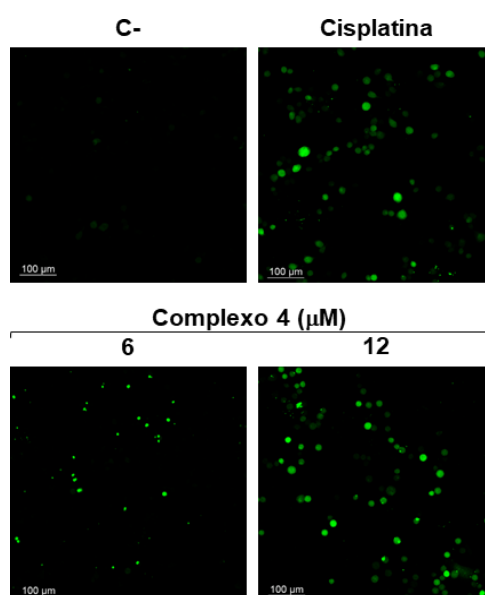


Figura 63 - Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo 4 (6 e 12 μM) e 50 μM de cisplatina por 24 horas, marcação com H_2DCFDA . Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor.

Estes resultados com a sonda H_2DCFDA sugerem que os complexos 1 e 4 induzem a geração de ROS intracelular na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, o que pode estar envolvido no processo de apoptose. No entanto, ainda que a sonda H_2DCFDA seja amplamente empregada na detecção de H_2O_2 intracelular e outros oxidantes, cuidados devem ser tomados na interpretação desses resultados. Segundo Kalyanaraman *et al.* (2012), a química redox

intracelular do ânion carboxilato H_2DCF é complexa, e várias limitações devem ser consideradas no uso desse ensaio. Por exemplo, H_2DCF pode ser oxidado pelo citocromo c que é liberado da mitocôndria para o citoplasma durante o processo de apoptose.

4.4.8 Detecção de Apoptose

Visto que os complexos de prata induziram o aumento de células na fração sub-G1, perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e geração de ROS na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, indicando a morte celular via apoptose, ensaios de marcação com Hoechst 33342 e iodeto de propídio (PI) foram realizados. A condensação da cromatina é uma das principais características da apoptose. O Hoechst 33342 é um corante permeável às células, se liga ao DNA e marca a cromatina condensada das células apoptóticas com brilho mais intenso do que a cromatina de células viáveis. Por outro lado, o iodeto de propídio (PI) somente se liga ao DNA de células com a membrana celular danificada, identificando células em apoptose tardia ou necrose.

As células MDA-MB-231 foram marcadas com Hoechst 33342/PI e examinadas por microscopia de fluorescência confocal, Figuras 64 e 65. As células do controle negativo (não tratadas) exibiram uma distribuição uniforme de fluorescência azul no núcleo.

As células foram tratadas com 5, 10 e 20 μM do complexo $[Ag(phen)(L1)](NO_3)$ (**1**) por 48 horas. Após o tratamento com **1**, foi observado que as células MDA-MB-231 apresentaram condensação da cromatina, demonstrada pelo brilho mais intenso do corante Hoechst 33342 em comparação com as células do controle negativo. Além disso, como o aumento da concentração de complexo, um maior número de células também foi positivo para o marcador PI, o que indica que a membrana celular sofreu danos sugerindo a apoptose tardia.

As células MDA-MB-231 também foram analisadas após o tratamento com 6 e 12 μM do complexo $[AgCl(PPh_3)_2(L4)]$ (**4**) por 24 horas. A condensação da cromatina também foi observada após o tratamento com **4**, assim como as células também foram positivas para PI, indicando apoptose tardia. O ensaio também foi realizado com a camptotecina (20 μM) nas mesmas condições experimentais, como controle positivo de apoptose. Alterações típicas de apoptose foram observadas nas células tratadas com camptotecina. Assim, os resultados do ensaio de coloração dupla Hoechst 33342/PI sugerem que os complexos **1** e **4** induzem apoptose nas células MDA-MB-231.

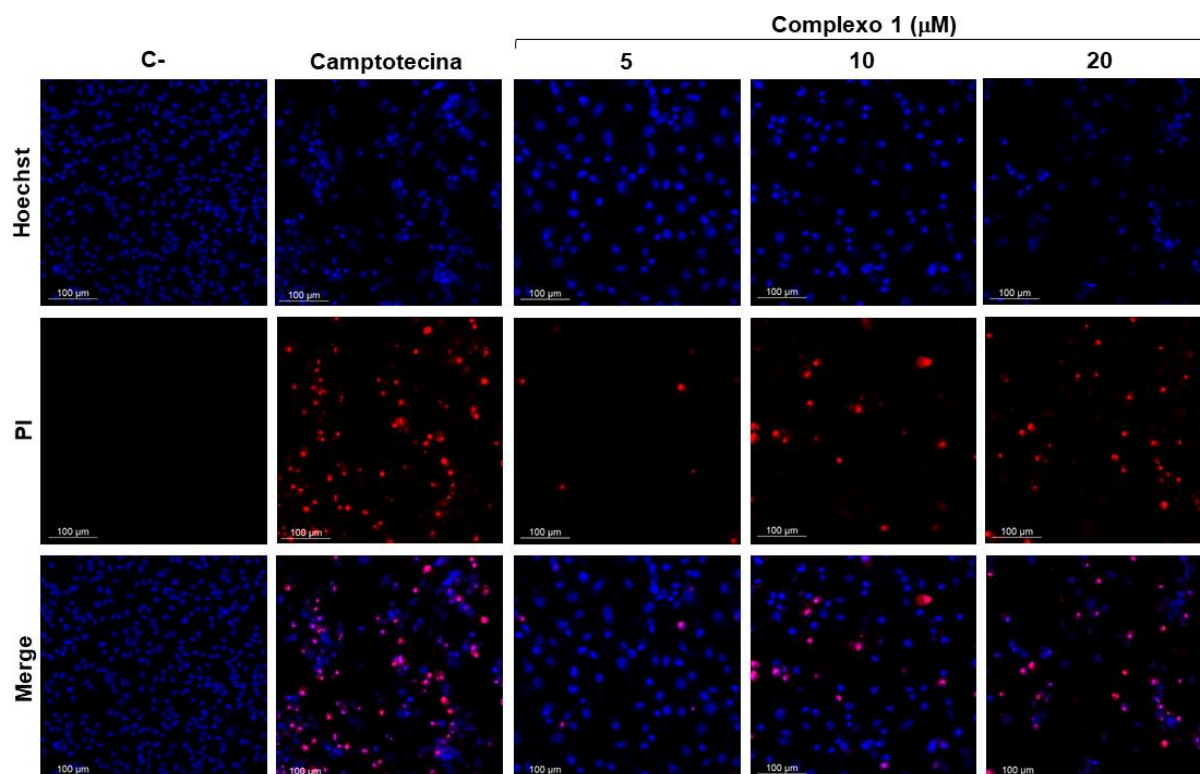


Figura 64 - Análise de morte celular induzida nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo 1 (5, 10 e 20 μM) e 20 μM de camptotecina por 48 horas, marcação com Hoechst 33342/PI. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor.

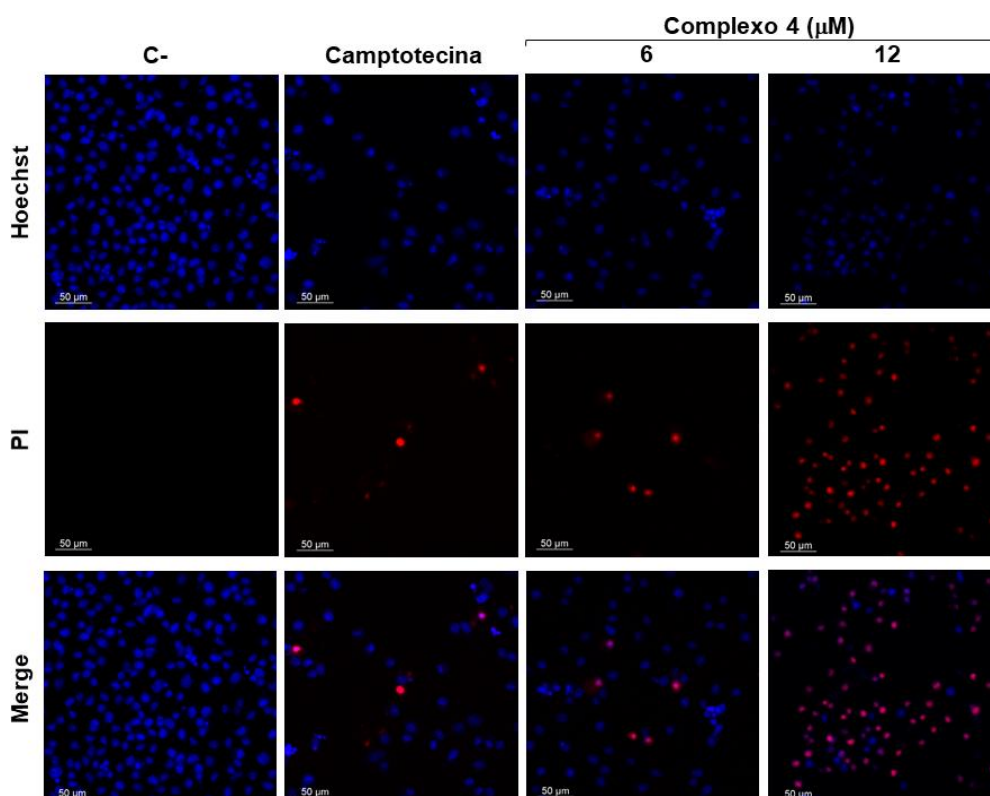


Figura 65 - Análise de morte celular induzida nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o complexo 4 (6 e 12 μM) e 20 μM de camptotecina por 24 horas, marcação com Hoechst 33342/PI. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. **Fonte:** Autor.

A fim de confirmar a apoptose induzida pelos complexos de prata (I) nas células MDA-MB-231, ensaios de citometria de fluxo com coloração dupla PE-Anexina V e 7-AAD foram realizados. O ensaio também foi realizado com a camptotecina nas mesmas condições experimentais, como controle positivo de apoptose.

A Anexina V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina externalizada na membrana celular de células em apoptose. Esta proteína pode ser conjugada com fluorocromos como a Ficoeritrina (PE), mantendo sua alta afinidade pelo fosfatidilserina. Uma vez que a externalização da fosfatidilserina ocorre nos estágios iniciais da apoptose, PE-Anexina V é uma sonda sensível para identificação de células em apoptose por citometria de fluxo. Células em apoptose tardia e necrose apresentam alterações na permeabilidade da membrana celular e podem ser marcadas com o corante 7-AAD (7-Amino-Actinomicina), um composto intercalador de DNA.

Os resultados dos ensaios com PE-Anexina V e 7-AAD foram analisados de acordo com os quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4) das Figuras 66–68. Q1 representa as células viáveis Anexina V⁻ e 7-AAD⁻, Q2 representa as células em apoptose recente Anexina V⁺ e 7-AAD⁻, Q3 representa as células em apoptose tardia Anexina V⁺ e 7-AAD⁺, e Q4 representa as células em necrose Anexina V⁻ e 7-AAD⁺.

As células MDA-MB-231 foram tratadas com 5, 10 e 20 μ M do complexo **1** por 48 horas, Figura 66. A porcentagem de células em necrose após o tratamento com **1** não foi significativa em comparação com o controle negativo (células não tratadas). Por outro lado, o complexo **1** induziu apoptose nas células MDA-MB-231 de maneira dependente da concentração. O tratamento com 20 μ M diminuiu o número de células viáveis de 82% (células não tratadas) para 45%, com 9% e 45% das células em apoptose recente e tardia, respectivamente. Uma vez que o complexo **1** demonstrou ser menos citotóxico na linhagem não tumoral MCF-10A (promissora seletividade para a linhagem MDA-MB-231), o ensaio também foi realizado com as células MCF-10A. Como mostrado na Figura 67, a maior concentração do complexo **1** (20 μ M) induziu 20% de apoptose nas células MCF-10A, evidenciando que **1** induz apoptose nas células tumorais MDA-MB-231 de forma mais eficiente. O tratamento com 40 μ M de camptotecina induziu 44% e 42% de apoptose nas células MDA-MB-231 e MCF-10A, respectivamente.

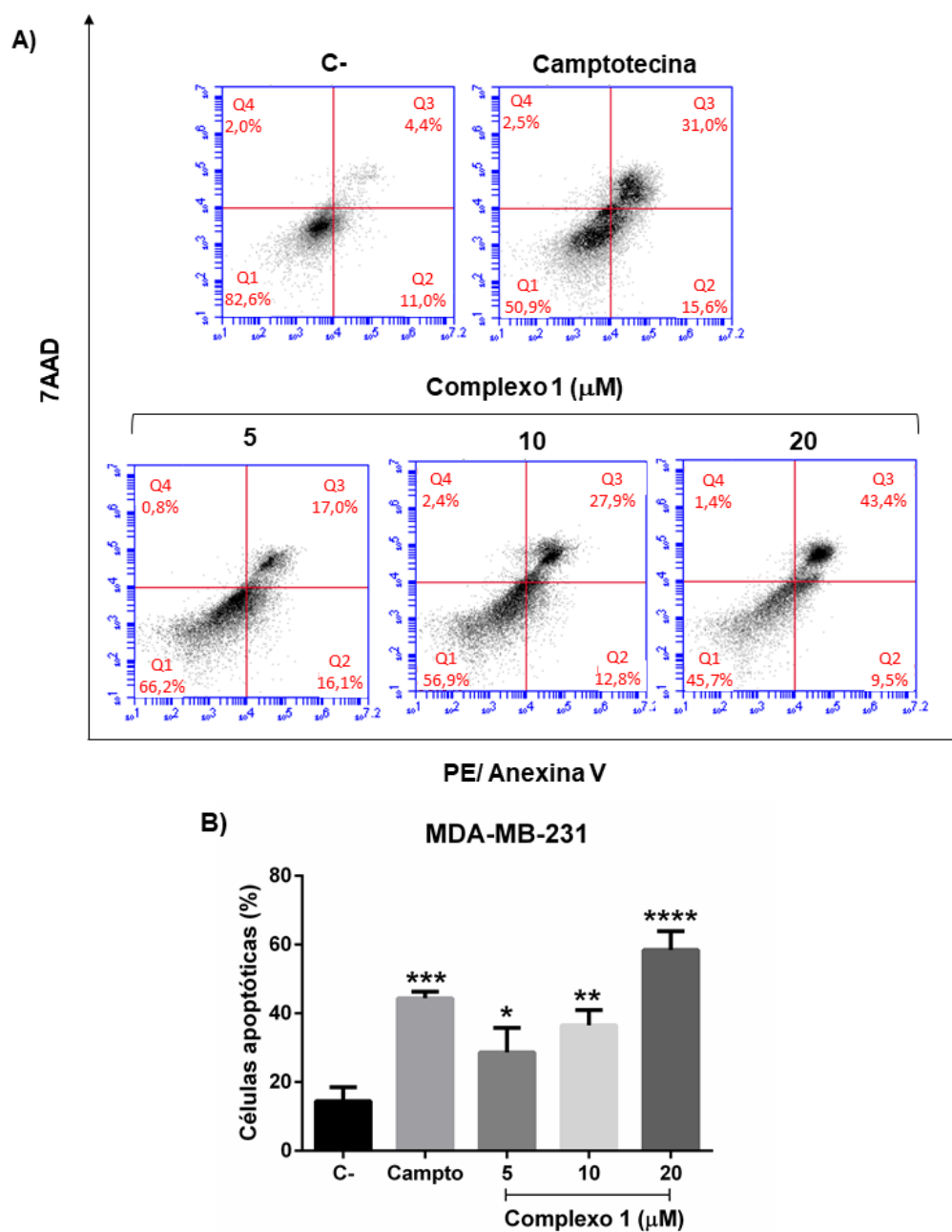


Figura 66 - Detecção de apoptose nas células MDA-MB-231 com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A). **A)** Dot plots representativos das células após o tratamento com diferentes concentrações de 1 e 40 μM de camptotecina por 48 horas. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células em apoptose. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor.

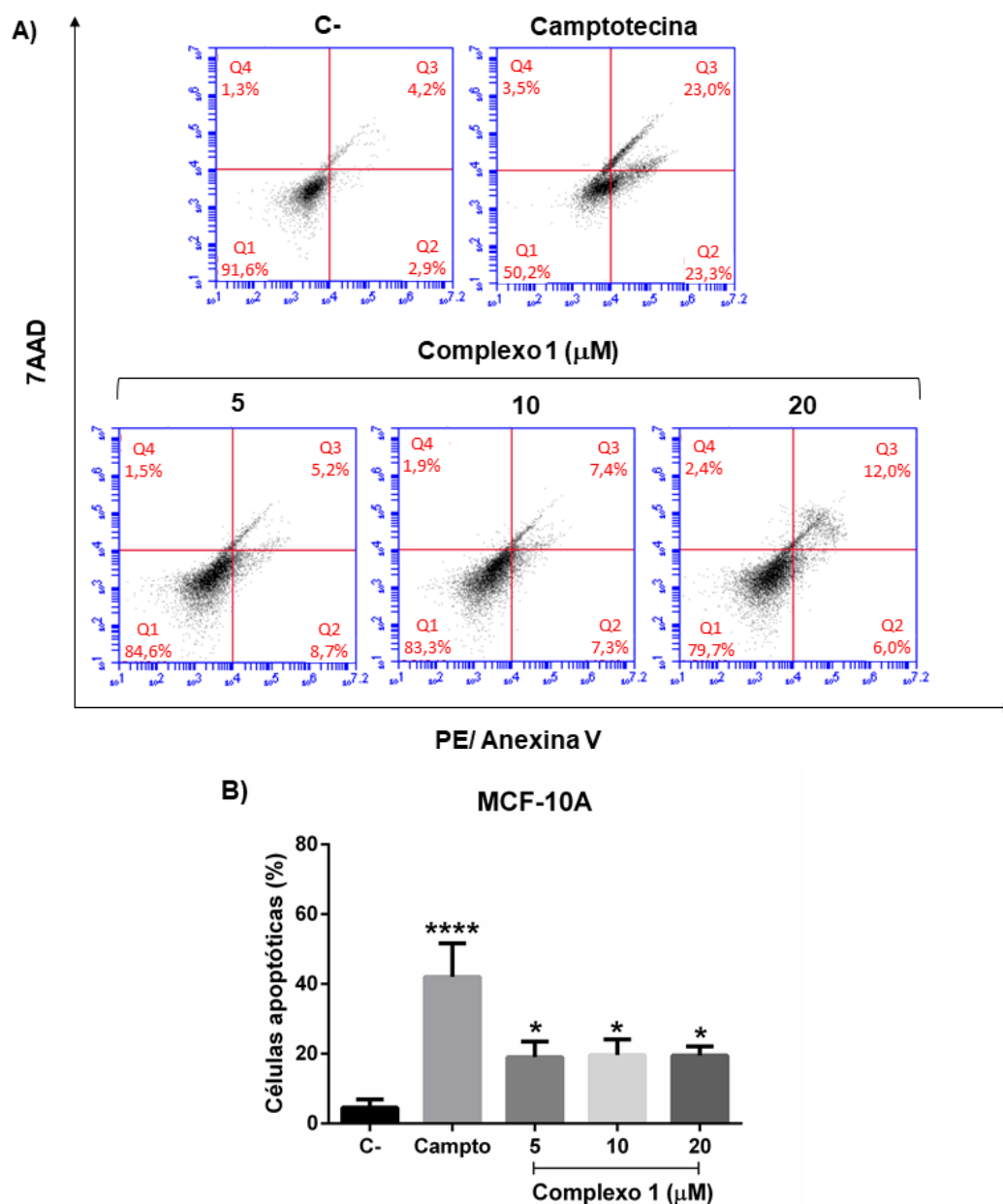


Figura 67 - Detecção de apoptose nas células MFC-10A com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A). **A)** *Dot plots* representativos das células após o tratamento com diferentes concentrações de 1 e 40 μM de camptotecina por 48 horas. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células em apoptose. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$ e **** $p \leq 0,0001$). **Fonte:** Autor.

O efeito do complexo 4 na indução de apoptose nas células MDA-MB-231 também foi analisado, as células foram tratadas com 6 e 12 μM de 4. Como mostrado na Figura 68, a porcentagem de células em apoptose aumentou após o tratamento com complexo 4 em comparação com as células do controle negativo. Além disso, a porcentagem de necrose foi insignificante nas células tratadas. A porcentagem total de células apoptóticas aumentou de

10,9% (controle negativo) para 69,8% após o tratamento com 12 μM de **4**. O tratamento com 20 μM de camptotecina induziu 43,4% de apoptose nas células MDA-MB-231.

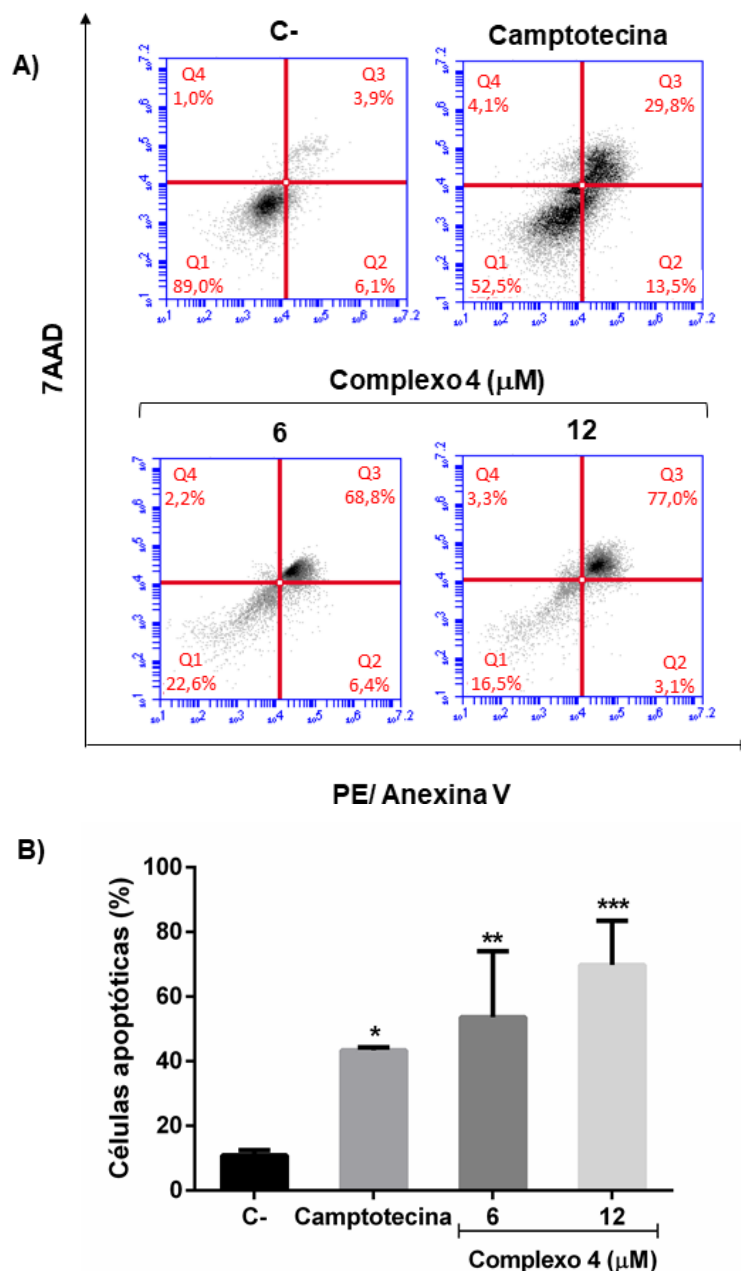


Figura 68 - Detecção de apoptose nas células MDA-MB-231 com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A). **A)** *Dot plots* representativos das células após o tratamento com 6 e 12 μM de **4** e 20 μM de camptotecina por 48 horas. **B)** Gráficos representativos da porcentagem de células em apoptose. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$). **Fonte:** Autor.

4.5 Considerações sobre os ensaios biológicos

Diversos estudos têm demonstrado o potencial antitumoral de complexos de prata (I) (MEDICI, 2016; LIANG, 2018). Inicialmente avaliamos a atividade citotóxica dos ligantes tiossemicarbazonas e novos complexos de prata frente as células tumorais das linhagens A549, MCF-7 e MDA-MB-231, utilizando o ensaio de redução do MTT. Nossos resultados demonstram que a citotoxicidade é potencializada após a coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas ao íon Ag^{I} , e que os complexos de prata (I) são mais citotóxicos do que o metalo-fármaco cisplatina. Particularmente, os compostos apresentam atividade citotóxica promissora na linhagem tumoral de mama triplo negativo MDA-MB-231. O efeito citotóxico dos complexos também foi avaliado na linhagem não tumoral MCF-10A. Observamos que os compostos são menos citotóxicos nas células MCF-10A, e exibem índice de seletividade (IS) maior do que o observado para a cisplatina nas mesmas condições experimentais. Com base nos valores de IC_{50} e IS, os complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (**1**) e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4})]$ (**4**) foram selecionados como representativos para ensaios de análise dos seus efeitos citotóxicos e apoptóticos nas células MDA-MB-231.

A inibição da viabilidade celular pode estar relacionada a morte celular e/ou parada do ciclo celular. O processo de morte celular programada pode ser relacionado a pelo menos três processos morfológicamente distintos, a apoptose (tipo I), autofagia (tipo II) e necrose (tipo III). A apoptose foi descrita pela primeira vez por Kerr *et al.* em 1972, e é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas específicas, como encolhimento e arredondamento da estrutura celular, condensação e fragmentação nuclear, formação de *blebbings* (bolhas) na membrana celular e perda de adesão celular com as células vizinhas e matriz celular. As alterações bioquímicas incluem fragmentação do DNA e translocação do fosfolipídeo fosfatidilserina para a superfície extracelular da membrana (OUYANG *et al.*, 2012).

A morfologia das células MDA-MB-231 foi analisada sob um microscópio invertido após o tratamento com diferentes concentrações dos complexos **1** e **4** por 48 horas. Observamos que ambos os complexos induziram alterações morfológicas típicas de apoptose, como encolhimento e arredondamento celular, e perda de adesão celular. Ensaio de marcação dupla com Hoechst 33342/PI por microscopia confocal demonstraram a condensação da cromatina das células MDA-MB-231, e mudanças na permeabilidade da membrana celular após o tratamento com os complexos **1** e **4**, sugerindo a apoptose tardia das células.

Uma população de células saudáveis possui um perfil de DNA nas fases G1, S e G2/M. Entretanto, células apoptóticas apresentam um conteúdo reduzido de DNA em comparação as células saudáveis, devido à fragmentação do DNA. Assim, as células apoptóticas são representadas por um pico correspondente a fração sub-G1 (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Verificamos por citometria de fluxo após a marcação das células MDA-MB-231 com iodeto de propídeo (PI), que o tratamento com ambos os complexos de prata levou ao aumento da porcentagem de células na fração sub-G1, evidenciando a indução de fragmentação do DNA. Além disso, a análise da distribuição do ciclo celular demonstrou que o complexo **1** diminuiu a porcentagem de células nas fases S e G2/M. Por outro lado, o complexo **4** induziu um aumento na população de células na fase S. Essas alterações na progressão do ciclo celular revelam que os complexos **1** e **4** podem afetar o processo de replicação do DNA e/ou causar danos ao DNA nas células MDA-MB-231.

Geralmente os fosfolipídeos da membrana celular estão distribuídos assimetricamente ao longo da membrana. Na maioria das células o fosfolipídeo fosfatidilserina (FS) é encontrado exclusivamente na porção intracelular da membrana. Nos estágios iniciais da apoptose, os resíduos de FS são translocados na membrana e externalizados. A externalização da fosfatidilserina (FS) é um importante sinal para reconhecimento e eliminação das células apoptóticas por macrófagos. Logo, o fosfolipídeo fosfatidilserina (FS) pode ser utilizado como marcador inicial do processo de apoptose. A proteína anexina V liga-se com alta especificidade à FS e é amplamente utilizada como sonda para detectar células apoptóticas (ELMORE, 2007). Para avaliar a indução de apoptose nas células MDA-MB-231, ensaios de marcação com PE-Anexina V para detecção da translocação da fosfatidilserina para a superfície celular externa da membrana, juntamente com o corante 7-AAD foram realizados por citometria de fluxo. Observamos que os complexos **1** e **4** foram capazes de induzir o aumento significativo de células marcadas positivamente com Anexina V⁺ e 7-AAD⁻ indicando apoptose recente, e células duplamente marcadas Anexina V⁺ e 7-AAD⁺ apontando apoptose tardia. Esses resultados sugerem que os efeitos citotóxicos observados para os complexos **1** e **4** nas células MDA-MB-231 são desencadeados por indução de morte celular via apoptose.

As mitocôndrias participam da manutenção de funções celulares vitais, no entanto, essas organelas também desempenham um papel fundamental no controle da apoptose celular. A apoptose pode ser iniciada por duas principais vias de sinalização, a via extrínseca e a via intrínseca (mitocondrial). A via intrínseca é controlada pelas mitocôndrias, e ativada por sinais de estresse intracelular que induzem a disfunção mitocondrial, tais como danos ao DNA,

estresse oxidativo e agentes citotóxicos. A permeabilização da membrana mitocondrial é um evento crucial na ativação da apoptose, que resulta em dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), um parâmetro essencial para as funções mitocondriais (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). A despolarização do $\Delta\Psi_m$ é um evento que ocorre nos estágios iniciais da apoptose, antes de quaisquer alterações morfológicas. O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) pode ser analisado utilizando corantes catiônicos fluorescentes que se acumulam na matriz mitocondrial. Para avaliar se a disfunção mitocondrial está envolvida no processo de indução de apoptose dos complexos **1** e **4**, ensaios com a sonda JC-1 foram realizados para examinar alterações no $\Delta\Psi_m$ das células MDA-MB-231. JC-1 é um corante lipofílico que se acumula e forma agregados (fluorescência vermelha) na matriz mitocondrial de células saudáveis. Por outro lado, em células apoptóticas (baixo $\Delta\Psi_m$) permanece na forma de monômeros (fluorescência verde) (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019). Verificamos que o tratamento com os complexos de prata causou a despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após 4 horas de tratamento, sugerindo que os compostos **1** e **4** induzem a apoptose das células MDA-MB-231 pela via mitocondrial.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel importante na sinalização celular e são essenciais para várias funções celulares. Em condições fisiológicas, ROS são geradas continuamente, e neutralizadas através do sistema antioxidante para manter a homeostase redox. Mudanças no equilíbrio redox, causadas por fatores endógenos ou exógenos podem causar um aumento nos níveis de ROS, resultando em estresse oxidativo. Em concentrações citotóxicas, as ROS podem desencadear a morte celular via apoptose através de danos a proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, membranas e organelas (CIRCU; AW, 2010). A apoptose induzida por muitos compostos da literatura é associada a geração de ROS intracelular e despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). O efeito dos complexos de prata nos níveis de ROS intracelular nas células MDA-MB-231 foi analisado com a sonda H_2DCFDA por microscopia confocal. Observamos que ambos os complexos induziram o aumento nos níveis de ROS intracelular após 24 horas de tratamento, o que sugere que a geração de ROS está envolvida no processo de apoptose.

Ensaio de ligação com o ctDNA foram realizados com os complexos **1** e **4** por titulação espectroscópica, dicroísmo circular e ensaios de competição com Hoechst 33258 e Tiazol Orange. Nossos resultados evidenciaram que os compostos de prata interagem fracamente com o ctDNA, o que sugere que os efeitos citotóxicos observados nas células MDA-MB-231 são decorrentes da interação com outros alvos intracelulares. Tal proposição está de acordo com

vários estudos sobre o mecanismo de ação antitumoral de complexos de prata e ouro, os quais demonstram que o DNA não é o principal alvo biológico desses compostos. Estes atuam principalmente nas mitocôndrias das células tumorais ou inibindo enzimas como a tiorredoxina redutase (TrxR) (MARLOYE *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, vários complexos metálicos têm atraído interesse devido a sua capacidade de atingir as mitocôndrias e induzir a apoptose via mitocondrial. Particularmente, compostos de ouro se destacam como "agentes antimitocondriais". Complexos de prata (I) também vêm sendo reportados na literatura por desencadear a apoptose e induzir a disfunção mitocondrial. Estudos mostram o envolvimento de múltiplos alvos no mecanismo de ação desses compostos, como das enzimas tiorredoxina redutase (TrxR) e topoisomerases, além de interações com o DNA. Por exemplo, complexos de prata (I) contendo ligantes 5,5-dietilbarbiturato e bis(difenilfosfina)alcanos induziram o aumento nos níveis de ROS e perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) nas células tumorais A549 e MCF-7, desencadeando a apoptose. Os complexos causaram danos ao DNA, o que está de acordo com os estudos de absorção celular que demonstram que os compostos entram no núcleo. Ensaios *in vitro* revelaram que os complexos interagem moderadamente com o DNA, entretanto, a presença de uma porção significativa dos complexos no citoplasma e membrana evidenciou que os complexos são capazes de interagir com outros alvos biológicos (YILMAZ *et al.*, 2017b). O complexo $[\text{Ag}(\text{NHC})_2][\text{AgBr}_2]$ (NHC = 1-benzil-3-metil-imidazol) desencadeou a morte celular via apoptose em células tumorais de ovário (A2870 e A2780cis/CP70). Ensaios sobre o mecanismo de ação demonstraram que a geração de ROS intracelular, danos ao DNA, inibição das enzimas tiorredoxina redutase (TrxR) e topoisomerase I estão envolvidos no processo de indução de apoptose. Os autores sugerem que a inibição da TrxR induz o aumento de ROS e que a inibição da topoisomerase I causa danos ao DNA, levando a apoptose (ALLISON *et al.*, 2017).

Estudos sobre o mecanismo de ação antitumoral de complexos de prata (I) contendo o ligante 1,10-fenantrolina (phen) ainda são escassos na literatura. Por exemplo, a citotoxicidade do complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{PTA})](\text{NO}_3)$ (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfadamantano) contra as células de melanoma da linhagem tumoral A375 foi atribuída a capacidade de intercalação do composto com o DNA (SMOLEŃSKI *et al.*, 2013). A atividade citotóxica de complexos do tipo $[\text{Ag}_2(\text{phen})_x(\text{OOC}-(\text{CH}_2)_y-\text{COO})] \cdot z\text{H}_2\text{O}$ ($x = 2$ ou 3 ; $y = 1-10$; $z = 1-4$) foi reportada contra as células tumorais de mama (MCF-7) e de ovário (SKOV-3). Apesar da capacidade de intercalação com o DNA observada *in vitro*, o tratamento com os complexos de prata não

induziu danos ao DNA ou aumento nos níveis de ROS, evidenciando que os compostos podem alcançar outros alvos biológicos (THORNTON *et al.*, 2016).

Atualmente, muitos estudos demonstram que vários complexos metálicos são capazes de inibir a enzima tiorredoxina redutase (TrxR), uma enzima da família de selenoproteínas que desempenham um papel importante no balanço redox intracelular (GANDIN; FERNANDES, 2015). A inibição das TrxRs pode desencadear a disfunção mitocondrial, levando eventualmente à apoptose celular (BINDOLI *et al.*, 2009). Em geral, a citotoxicidade dos compostos de ouro (I/III) está relacionada à inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR). Ainda não há relatos na literatura da inibição da TrxR por compostos de prata (I) contendo o ligante 1,10-fenantrolina. Até o momento, pouco se conhece sobre essa ação inibitória envolvendo complexos de prata (I) contendo ligantes fosfinas. O primeiro exemplo de um complexo de prata (I) com fosfina atuando como inibidor da TrxR foi reportado por Santini *et al.* em 2011. O complexo $[Ag(PTA)_4]PF_6$ (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfadamantano) foi ativo contra diferentes linhagens de células tumorais, e sua atividade foi proposta como resultado de sua capacidade de inibir a TrxR ($IC_{50} = 10,3$ nM). Recentemente, Landini *et al.* reportaram o potencial de inibição da TrxR de complexos do tipo $[MX(PEt_3)]$ e $[M(PEt_3)_2]^+$ ($M = Ag, Au$; $X =$ haletos ; $PEt_3 =$ trietilfosfina). Os complexos de prata inibiram a TrxR ($IC_{50} = 11\text{--}49$ nM), porém, seus análogos de ouro são inibidores mais potentes da TrxR. De acordo com os autores, a capacidade de inibição da TrxR moderada dos compostos de prata em comparação com os compostos de ouro sugere que um mecanismo adicional de dano celular deve ser responsável por seus efeitos citotóxicos.

Com base nos resultados discutidos acima para os complexos de prata (I), sugerimos que os complexos **1** e **4** podem atingir as mitocôndrias desencadeando os efeitos citotóxicos observados nas células MDA-MB-231. Porém, novos estudos são necessários para maior esclarecimento do mecanismo de ação dos compostos, como: i) analisar se os compostos são capazes de entrar no núcleo, de forma que a interação com o DNA possa ser significativa para a citotoxicidade; ii) confirmar se os complexos induzem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular com uso de novas sondas fluorescentes; iii) avaliar a interação dos complexos com a enzima tiorredoxina redutase (TrxR), a fim de relacionar a inibição da TrxR com o aumento dos níveis de ROS. Diante disso, a Figura 69 apresenta uma proposta do modo de ação dos complexos de prata que desencadeiam os efeitos citotóxicos nas células tumorais MDA-MB-231.

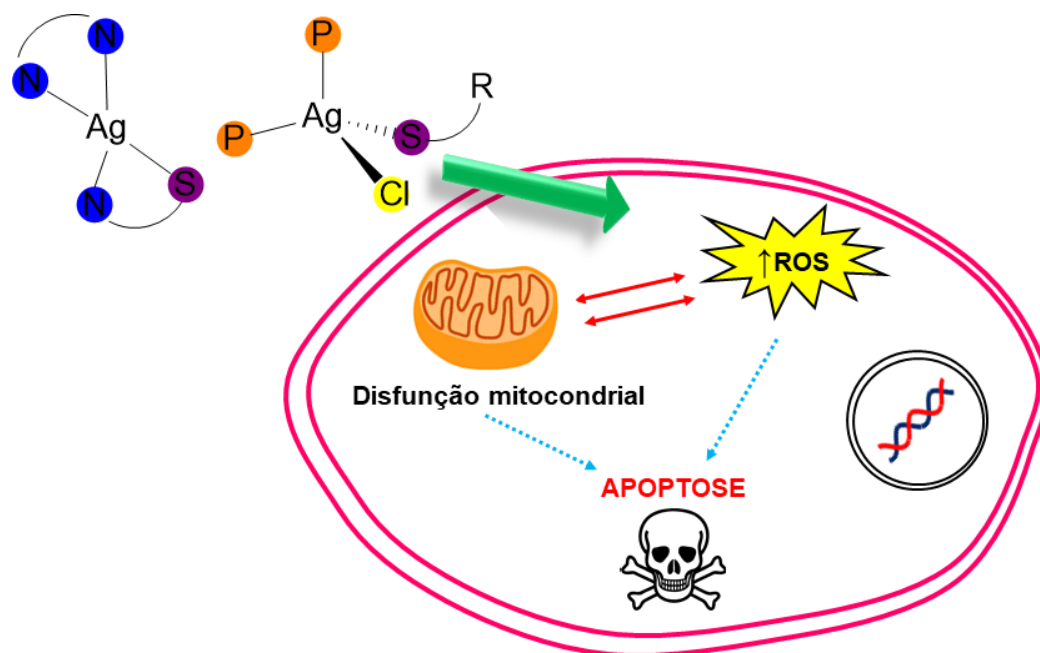


Figura 69 – Possível mecanismo de ação dos compostos de prata nas células MDA-MB-231. **Fonte:** Autor.

5 CONCLUSÕES

Os compostos de prata foram obtidos com bom rendimento e alta pureza. Os ligantes tiossemicarbazonas atuam como ligantes *N,S*-doadores nos compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ e *S*-doadores nos compostos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$. Estudos por difração de raios X dos compostos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L5})]$ e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L6})]$ confirmaram a obtenção de complexos de Ag^{I} tetracoordenados, com a tiossemicarbazona coordenada via *S*-monodentada, e coligantes clorido e trifenilfosfina.

Estudos da estabilidade química dos complexos em solução por um período de 48 horas demonstraram que os complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ são estáveis em DMSO, tampão Tris-HCl e meio de cultura DMEM sob as condições estudadas. Os complexos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{TSC})]$ são estáveis em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20% v/v), e uma quantidade considerável dos compostos permanece inalterada em tampão Tris-HCl embora tenha sido observado mudanças nos espectros de UV-Vis dos complexos após 48 horas.

Os compostos de prata **1–6** apresentaram promissora citotoxicidade frente as linhagens tumorais A549, MCF-7 e MDA-MB-231. Particularmente, os complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$ apresentaram boa seletividade para a linhagem MDA-MB-231, comparando os resultados de citotoxicidade para a linhagem não tumoral MCF-10A. Portanto, a substituição

do ligante tiouréia no composto protótipo por tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas (2-formilpiridina tiossemicarbazonas) resultou em compostos ativos e seletivos frente as células tumorais de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

Os ensaios de quantificação celular de prata mostraram que os complexos são internalizados nas células MDA-MB-231. Os compostos $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L6})]$ apresentaram maior taxa de internalização do que os compostos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$. Esses resultados sugerem que os ligantes trifenilfosfina desempenham um papel importante na passagem através da membrana celular.

Ensaio de morte celular com as células MDA-MB-231 revelaram que os complexos $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1})](\text{NO}_3)$ (**1**) e $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{VTSC})]$ (**4**) induzem alterações morfológicas típicas de apoptose e aumento da população de células na fração sub-G1. Além disso, ambos os compostos foram capazes de induzir a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem MDA-MB-231. Ensaio de detecção de apoptose confirmaram que os complexos **1** e **4** induzem a apoptose das células MDA-MB-231.

Estudos de ligação com o ctDNA demonstraram que os complexos **1** e **4** são capazes de interagir com essa biomolécula. Os ensaios de titulação espectroscópica e discoísmo circular revelaram que a interação é fraca, uma vez que a estrutura do B-DNA não é alterada. O ensaio de competição com Hoechst 33258 mostrou que os compostos são capazes de deslocar o corante do sulco menor, embora demonstrem ser ligantes mais fracos do que o Hoechst. Esses resultados implicam que outros alvos intracelulares são importantes para a atividade dos complexos.

Embora o(s) alvo(s) biológico(s) responsável por desencadear os efeitos citotóxicos continue desconhecido, nossos resultados indicam as mitocôndrias como um potencial alvo intracelular ao invés do DNA. O mecanismo de ação envolvido na via mitocondrial ainda não foi elucidado, mas a interação com alvos enzimáticos, como a tiorredoxina redutase (TrxR), pode ser um caminho. Os resultados desse trabalho demonstram que os compostos de prata podem ser potencialmente importantes no desenvolvimento de novos metalo-fármacos para o tratamento do câncer de mama triplo negativo (TNBC).

6 REFERÊNCIAS

Instituto Nacional do Câncer INCA. Câncer de mama. Acessado em 12/05/2020

Instituto Nacional do Câncer INCA. Estatísticas de câncer. Acessado em 12/05/2020

World Health Organization. Cancer. Fact sheets. Acessado em 12/05/2020.

ABRAMSON, V. G. et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8–16, 2015.

ALI, K. A.; ABD-ELZAHER, M. M.; MAHMOUD, K. Synthesis and Anticancer Properties of Silver(I) Complexes Containing 2,6-Bis(substituted)pyridine Derivatives. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

ALLISON, S. J. et al. Preclinical anti-cancer activity and multiple mechanisms of action of a cationic silver complex bearing N-heterocyclic carbene ligands. **Cancer Letters**, v. 403, p. 98–107, 2017.

ARDIZZOIA, G. A. et al. Silver(I) Pyrazolates. Synthesis and X-ray and ³¹P-NMR Characterization of Triphenylphosphine Complexes and Their Reactivity toward Heterocumulenes. **Inorganic Chemistry**, v. 36, n. 11, p. 2321–2328, 1997.

ASHFIELD, L. J. et al. Functionalized thiosemicarbazone clusters of copper(I) and silver(I). **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 4121–4123, 2004.

ASLAM, S. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT calculations and antimicrobial properties of silver(I) complexes of 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Polyhedron**, v. 115, p. 212–218, 2016.

BALACHANDRAN, C. et al. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, n. October 2017, p. 208–221, 2018.

BANTI, C. N. et al. Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 8681–8696, 2016.

BANTI, C. N.; HADJIKAKOU, S. K. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(i) compounds. **Metallomics**, v. 5, n. 6, p. 569–596, 2013.

BARNARD, P. J.; BERNERS-PRICE, S. J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13- 14 SPEC. ISS., p. 1889–1902, 2007.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour complexes and DNA interactions and their tools of analysis: An approach to metalointercalators. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: Towards new

targets. **Chemical Communications**, v. 49, n. 45, p. 5106–5131, 2013.

BENCINI, A.; LIPPOLIS, V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17–18, p. 2096–2180, 2010.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31–39, 2004.

BERGAMO, A.; DYSON, P. J.; SAVA, G. The mechanism of tumour cell death by metal-based anticancer drugs is not only a matter of DNA interactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 17–33, 2018.

BERMEJO, M. R. et al. Checking the route to cluster helicates. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 24, p. 3852–3863, 2008.

BERNERS-PRICE, S. J. et al. Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver(I) complexes: Comparison with copper and gold. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 285–295, 1988.

BERNERS-PRICE, S. J.; SADLER, P. J. Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity. **Bioinorganic Chemistry. Structure and Bonding**, p. 27–102, 1988.

BERTRAND, B.; CASINI, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: The promise of anticancer gold organometallic compounds. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 11, p. 4209–4219, 2014.

BINDOLI, A. et al. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 11–12, p. 1692–1707, 2009.

BOGER, D. L. et al. A simple, high-resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 25, p. 5878–5891, 2001.

BOGER, D. L.; TSE, W. C. Thiazole orange as the fluorescent intercalator in a high resolution fid assay for determining DNA binding affinity and sequence selectivity of small molecules. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 2511–2518, 2001.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 197–206, 2008.

BUCEVIČIUS, J.; LUKINAVIČIUS, G.; GERASIMAITE, R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. **Chemosensors**, v. 6, n. 2, 2018.

CARLOS LIMA, J.; RODRIGUEZ, L. Phosphine-Gold(I) Compounds as Anticancer Agents: General Description and Mechanisms of Action. **Anti-Cancer Agents in Medicinal**

Chemistry, v. 11, n. 10, p. 921–928, 2011.

CASAS, J. S.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 209, n. 1, p. 197–261, 2000.

CASTIÑEIRAS, A. et al. Luminescent complexes of silver(I) with pyridylbis(3-hexamethyleneiminyl thiosemicarbazone): Effect of the counterion on the nuclearity. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 13, p. 3787–3796, 2012.

CASTINEIRAS, A.; PEDRIDO, R. Novel fluorescent cationic silver thiosemicarbazone clusters containing different eight-membered Ag₄S₄ metallacycles. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 4847–4855, 2009.

CASTIÑEIRAS, A.; PEDRIDO, R. Factors involved in the nuclearity of silver thiosemicarbazone clusters: Cocrystallization of two different sized tetranuclear silver(I) clusters derived from a phosphinothiosemicarbazone ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 13, p. 5534–5536, 2008.

CHAVES, J. D. S. et al. Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 727–739, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.052>>.

CHELOPO, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 407–414, 2013.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

COLINA-VEGAS, L.; VILLARREAL, W.; NAVARRO, M. **Copper(I)–phosphine complexes: a promising approach in the search for antitumor agents**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

COYLE, B. et al. Mode of anti-fungal activity of 1, 10-phenanthroline and its Cu (II), Mn (II) and Ag (I) complexes. **BioMetals**, v. 16, p. 321–329, 2003.

CREAVEN, B. S. et al. Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and silver(I) complexes of hydroxynitrocoumarins: X-ray crystal structures of [Cu(hnc) 2(H₂O)₂] · 2H₂O and [Ag(hnc)] (hncH = 4-hydroxy-3-nitro-2H-chromen-2-one). **Polyhedron**, v. 24, n. 8, p. 949–957, 2005.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795–808, 1992.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020.

DENG, J. et al. Designing anticancer copper(II) complexes by optimizing 2-pyridine-thiosemicarbazone ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 442–452,

2018.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, v. 16, n. 2, p. 36–43, 2009.

DOROSTI, Z. et al. Mutual action of anticancer and antiparasitic drugs: Are there any shared targets? **Future Oncology**, v. 10, n. 15, p. 2529–2539, 2014.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695–2707, 2002.

ELLAHIOUI, Y.; PRASHAR, S.; GÓMEZ-RUIZ, S. Anticancer applications and recent investigations of metallodrugs based on gallium, tin and titanium. **Inorganics**, v. 5, n. 1, 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ENGELBRECHT, Z.; MEIJBOOM, R.; CRONJÉ, M. J. The ability of silver(I) thiocyanate 4-methoxyphenyl phosphine to induce apoptotic cell death in esophageal cancer cells is correlated to mitochondrial perturbations. **BioMetals**, v. 31, n. 2, p. 189–202, 2018.

ERXLEBEN, A. Mitochondria-Targeting Anticancer Metal Complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 694–728, 2019.

ESPURI, P. F. et al. Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 419–432, 2019.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

FINCH, R. A. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 983–991, 2000.

FUERTES, M. et al. Anticancer Compounds as Leishmanicidal Drugs: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 433–439, 2008.

GANDIN, V.; FERNANDES, A. P. Metal- and semimetal-containing inhibitors of thioredoxin reductase as anticancer agents. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12732–12756, 2015.

GANDRA, R. M. et al. Antifungal potential of copper(II), Manganese(II) and silver(I) 1,10-phenanthroline chelates against multidrug-resistant fungal species forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the planktonic and biofilm lifestyles. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–11, 2017.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the

characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 81–122, 1971.

GU, S. S. et al. Mitochondria-localizing N-heterocyclic thiosemicarbazone copper complexes with good cytotoxicity and high antimetastatic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 654–664, 2019.

HALIM, S. N. A. A. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of silver(I) complexes with mixed-ligands of thiosemicarbazones and diphenyl(p-tolyl)phosphine as biological agents. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 72, n. 5–7, p. 879–893, 2019.

HALL, M. D. et al. Say no to DMSO: Dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. **Cancer Research**, v. 74, n. 14, p. 3913–3922, 2014.

HAN, M. et al. Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435/DOX cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, p. 2640–2649, 2014.

HEFFETER, P. et al. Anticancer thiosemicarbazones: Chemical properties, interaction with iron metabolism, and resistance development. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 30, n. 8, p. 1062–1082, 2019.

HUMAN-ENGELBRECHT, Z.; MEIJBOOM, R.; CRONJÉ, M. J. Apoptosis-inducing ability of silver(I) cyanide-phosphines useful for anti-cancer studies. **Cytotechnology**, v. 69, n. 4, p. 591–600, 2017.

HUMAN, Z. et al. The induction of cell death by phosphine silver(I) thiocyanate complexes in SNO-esophageal cancer cells. **BioMetals**, v. 28, n. 1, p. 219–228, 2015.

JONES, C. J. **d- and f-block chemistry**. The Royal Society of Chemistry, 2002.

JONES, C.; THORNBACK, J. “**Medicinal Applications of Coordination Chemistry**”. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2007.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KARP, J. E. et al. A Phase I study of the novel ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine®) in combination with the nucleoside analog fludarabine for patients with refractory acute leukemias and aggressive myelopro. **Leukemia Research**, v. 32, n. 1, p. 71–77, 2008.

KELLETT, A. et al. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 4, p. 971–988, 2019.

KENNY, R. G.; MARMION, C. J. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs - A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens? **Chemical Reviews**, v. 119, n. 2, p. 1058–1137, 2019.

KHAN, A. et al. Enhancement in anti-tubercular activity of indole based thiosemicarbazones on complexation with copper(I) and silver(I) halides: Structure elucidation, evaluation and

- molecular modelling. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, n. March, p. 303–318, 2018.
- KIM, J. H. et al. Gold(I/III)-Phosphine Complexes as Potent Antiproliferative Agents. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.
- KLINKERT, M.-; HEUSSLER, V. The Use of Anticancer Drugs in Antiparasitic Chemotherapy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 131–143, 2006.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 99–163, 2007.
- KUNOS, C. A. et al. Phase I trial of daily triapine in combination with cisplatin chemotherapy for advanced-stage malignancies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 201–207, 2017.
- LEVINA, A.; CRANS, D. C.; LAY, P. A. Speciation of metal drugs, supplements and toxins in media and bodily fluids controls in vitro activities. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 473–498, 2017.
- LI, M. X. et al. Synthesis, crystal structures, and biological activities of 2-thiophene N(4)-methylthiosemicarbazone and its unusual hexanuclear silver(I) cluster. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 13, n. 11, p. 1268–1271, 2010.
- LIANG, X. et al. Recent advances in the medical use of silver complex. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 62–80, 2018.
- LIU, H. K.; SADLER, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 5, p. 349–359, 2011.
- LIU, J. et al. Functionalization and cancer-targeting design of ruthenium complexes for precise cancer therapy. **Chemical Communications**, v. 55, n. 67, p. 9904–9914, 2019.
- LOBANA, T. S. et al. The influence of substituents at the C2 carbon of thiosemicarbazones on bonding and nuclearity of silver(I) complexes. **Polyhedron**, v. 27, n. 11, p. 2251–2258, 2008a.
- LOBANA, T. S. et al. Versatility of thiosemicarbazones in the construction of monomers, dimers and hydrogen-bonded networks of silver(I) complexes. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 4, p. 1203–1212, 2008b.
- LOBANA, T. S. et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals- An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 7–8, p. 977–1055, 2009a.
- LOBANA, T. S. et al. Coinage metal derivatives of salicylaldehyde thiosemicarbazones: Synthesis, structures, bond isomerism and H-bonded networks. **Polyhedron**, v. 28, n. 8, p. 1583–1593, 2009b.
- LOBANA, T. S. et al. Thiosemicarbazone derivatives of copper(I): Influence of substituents (R) at N1 atom of [(C₅H₄N)HC₂=N 3N₂H-C1(=S)N₁HR] in the formation of 1D or 2D networks of copper(I) complexes. **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie**, v. 636, n. 15, p. 2698–2703, 2010.
- LOBANA, T. S. et al. Coinage (Cu,Ag) metal derivatives of salicylaldehyde N-

ethylthiosemicarbazone: Synthesis, spectroscopy, and structures. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 1750–1764, 2012.

LOBANA, T. S. et al. Synthesis, structures, spectroscopy and antimicrobial properties of complexes of copper(II) with salicylaldehyde N-substituted thiosemicarbazones and 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 145–154, 2014.

LOBANA, T. S.; SHARMA, R.; BUTCHER, R. J. Synthesis, spectroscopy and structures of halogen and sulfur-bridged dinuclear silver(I) complexes with N1-substituted thiophene-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. **Polyhedron**, v. 28, n. 6, p. 1103–1110, 2009.

MAKEDONAS, C.; MITSOPOULOU, C. A. The relationship between aromaticity and charge-transfer transitions: A combined study of square-planar metal complexes based on DFT, NMR and nucleus-independent chemical shifts. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 12, p. 2460–2468, 2006.

MARLOYE, M. et al. A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. **Future Medicinal Chemistry**, 2016.

MCCANN, M. et al. Deciphering the Antimicrobial Activity of Phenanthroline Chelators. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2703–2714, 2012.

MCFARLAND, S. A. et al. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 56, p. 23–27, 2020.

MCFARLANE, W. et al. Silver (I) complexes with heterocyclic thiones and tertiary phosphines as ligands. Part 3. Solution behaviour of mononuclear complexes of silver(I) nitrate. The crystal structure of bis(triphenylphosphino)bis(benzoxazoline-2-thione)silver(I) nitrate. **Inorganica Chimica Acta**, v. 281, n. 2, p. 121–125, 1998.

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 2015.

MEDICI, S. et al. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327–328, p. 349–359, 2016.

MEDICI, S. et al. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 5923–5943, 2019.

MEIJBOOM, R.; BOWEN, R. J.; BERNERS-PRICE, S. J. Coordination complexes of silver(I) with tertiary phosphine and related ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 3–4, p. 325–342, 2009.

MIESSLER, G. L.; TARR, D. A. **Inorganic Chemistry**. Third ed. [s.l.] Prentice Hall, 2003.

MIJNENDONCKX, K. et al. Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance. **BioMetals**, v. 26, n. 4, p. 609–621, 2013.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MROZEK-WILCZKIEWICZ, A. et al. Anticancer activity of the thiosemicarbazones that are based on di-2-pyridine ketone and quinoline moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 180–194, 2019.

MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 144–153, 2014.

MUJAHID, M. et al. Novel silver(I) complexes of coumarin oxyacetate ligands and their phenanthroline adducts: Biological activity, structural and spectroscopic characterisation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 163, p. 53–67, 2016.

NAKAMOTO K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. [s.l.] New York: John Wiley & Sons, 1978.

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 599–616, 2017.

NG, C. H. et al. Selective anticancer copper(ii)-mixed ligand complexes: Targeting of ROS and proteasomes. **Metallomics**, v. 6, n. 4, p. 892–906, 2014.

OLIVEIRA, C. G. et al. Palladium(ii) complexes with thiosemicarbazones derived from pyrene as topoisomerase IB inhibitors. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 44, p. 16509–16517, 2019.

OLIVEIRA, A. B. De et al. 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde thiosemicarbazone. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 69, p. o1861, 2013.

ONODERA, K. et al. Synthesis, reaction and structure of a highly light-stable silver(i) cluster with an Ag₄S₄N₄ core having a tridentate 4 N-morpholyl 2-acetylpyridine thiosemicarbazone ligand: Use of water-soluble silver(i) carboxylates as a silver(i) source. **Dalton Transactions**, n. 33, p. 3646–3652, 2007.

OTT, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 11–12, p. 1670–1681, 2009.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

PAGES, B. J. et al. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505–3526, 2015.

PAPATHANASIOU, P. et al. Synthesis of gold(I), silver(I) and copper(I) complexes containing substituted (2-aminophenyl)phosphines. Molecular structures of [AuI(2-H₂ NC₆H₄PPh₂)], [AuI{(±)-2-H₂ NC₆H₄PM₂Ph}] and (±)- [Cu(2-H₂ NC₆H₄PPh₂)₂]PF₆. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, p. 3435–3443, 1997.

PATRA, M. et al. DMSO-mediated ligand dissociation: Renaissance for biological activity of N-heterocyclic-[Ru(η⁶-arene)Cl₂] drug candidates. **Chemistry - A European Journal**, v. 19,

n. 44, p. 14768–14772, 2013.

PEARSON, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533–3539, 1963.

PEBERDY, J. C. et al. Influence of surface shape on DNA binding of bimetallo helicates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 11–12, p. 1937–1945, 2007.

PEDRIDO, R. et al. Coordinative trends of a tridentate thiosemicarbazone ligand: Synthesis, characterization, luminescence studies and desulfurization processes. **Dalton Transactions**, n. 39, p. 8329–8340, 2009.

POURSHOJAEI, Y. et al. Phenoxyethyl Piperidine/Morpholine Derivatives as PAS and CAS Inhibitors of Cholinesterases: Insights for Future Drug Design. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19855, 2019.

POYRAZ, 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**, v. 375, n. 1, p. 114–121, 2011.

PUCKETT, C. A.; ERNST, R. J.; BARTON, J. K. Exploring the cellular accumulation of metal complexes. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1159–1170, 2010.

QI, J. et al. Synthesis, antiproliferative activity and mechanism of gallium(III)-thiosemicarbazone complexes as potential anti-breast cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 154, p. 91–100, 2018.

QIAO, C. J. et al. Synthesis, crystal structure and electrochemical properties of a novel tetranuclear silver(I) cluster based on 1,1'-bis[(2-hydroxybenzylidene)thiocarbonohydrazono-1-ethyl] ferrocene (FcL). **Inorganic Chemistry Communications**, v. 12, n. 10, p. 1057–1060, 2009.

RAO, V. A. et al. The iron chelator Dp44mT causes DNA damage and selective inhibition of topoisomerase IIA in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p. 948–957, 2009.

RAUF, M. K. et al. Synthesis, characterization and urease inhibition, in vitro anticancer and antileishmanial studies of Ni(II) complexes with N,N,N'-trisubstituted thioureas. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 541–554, 2015.

REDDY, S. T. et al. Gold(i) and gold(iii) phosphine complexes: synthesis, anticancer activities towards 2D and 3D cancer models, and apoptosis inducing properties. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 43, p. 15312–15323, 2018a.

REDDY, T. S. et al. Synthesis of gold(I) phosphine complexes containing the 2-BrC6F4PPh2 ligand: Evaluation of anticancer activity in 2D and 3D spheroidal models of HeLa cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 291–301, 2018b.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of**

Biochemistry and Biophysics, v. 576, p. 49–60, 2015.

REJMUND, M. et al. Piperazinyl fragment improves anticancer activity of Triapine. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–25, 2018.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

RODER, C.; THOMSON, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. **Drugs in R and D**, v. 15, n. 1, p. 13–20, 2015.

SAINIS, I. et al. New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, p. 114–124, 2016.

SCHEFFLER, H.; YOU, Y.; OTT, I. Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes. **Polyhedron**, v. 29, n. 1, p. 66–69, 2010.

SCHELMAN, W. R. et al. A phase i study of Triapine® in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1147–1156, 2009.

SEGURA, D. F. et al. Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N,N-chelating ligands and thiourea: X-ray structure of $[\{ \text{Ag}(\text{bpy})(\mu\text{-tu}) \} _2](\text{NO}_3)_2$ (bpy = 2,2'-bipyridine; Tu = thiourea). **Polyhedron**, v. 79, p. 197–206, 2014.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47 REV. ISS. 6, p. 7265–7279, 2003.

SIMPSON, P. V. et al. Metal-based antitumor compounds: Beyond cisplatin. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 119–135, 2019.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio-Protocol**, v. 9, n. 1, p. e3128, 2019.

SMOLEŃSKI, P. et al. New water-soluble polypyridine silver(i) derivatives of 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) with significant antimicrobial and antiproliferative activities. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 18, p. 6572–6581, 2013.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2009.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733–740, 2007.

TAO, Z. Q. et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333–338, 2015.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e

importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

THORNTON, L. et al. Water-soluble and photo-stable silver(I) dicarboxylate complexes containing 1,10-phenanthroline ligands: Antimicrobial and anticancer chemotherapeutic potential, DNA interactions and antioxidant activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 159, p. 120–132, 2016.

VENKATACHALAM, T. K.; PIERENS, G. K.; REUTENS, D. C. Synthesis, NMR structural characterization and molecular modeling of substituted thiosemicarbazones and semicarbazones using DFT calculations to prove the syn/anti isomer formation. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 98–105, 2014.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, 2003.

VIGANOR, L. et al. The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Anti-biotic Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1280–1302, 2017.

VOJTEK, M. et al. Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 4, p. 1044–1058, 2019.

WALLACE, R. et al. Observations on the Antileukemic Activity of Pyridine- 2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone and Thiocarbohydrazone. **Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 167–170, 1956.

WHEATE, N. J. et al. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 627–648, 2007.

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113–8127, 2010.

YILMAZ, V. T. et al. Synthesis, structures and biomolecular interactions of new silver(i) 5,5-diethylbarbiturate complexes of monophosphines targeting Gram-positive bacteria and breast cancer cells. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 25, p. 8110–8124, 2017a.

YILMAZ, V. T. et al. Structures and biochemical evaluation of silver(I) 5,5-diethylbarbiturate complexes with bis(diphenylphosphino)alkanes as potential antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 901–916, 2017b.

YOUNGS, W. J. et al. Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole. **Metal-Based Drugs**, v. 2008, p. 1–7, 2008.

YU, Y. et al. The potent and novel thiosemicarbazone chelators Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine-4,4-dimethyl-3- thiosemicarbazone affect crucial thiol systems required for ribonucleotide reductase activity. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 921–931, 2011.

ZAKI, M.; ARJMAND, F.; TABASSUM, S. Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action.

Inorganica Chimica Acta, v. 444, p. 1–22, 2016.

ZAKI, M.; HAIRAT, S.; AAZAM, E. S. Scope of organometallic compounds based on transition metal-arene systems as anticancer agents: Starting from the classical paradigm to targeting multiple strategies. **RSC Advances**, v. 9, n. 6, p. 3239–3278, 2019.

ZARTILAS, S. et al. Tetrameric 1:1 and monomeric 1:3 complexes of silver(I) halides with tri(p-tolyl)-phosphine: A structural and biological study. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, n. 3, p. 1003–1010, 2009.

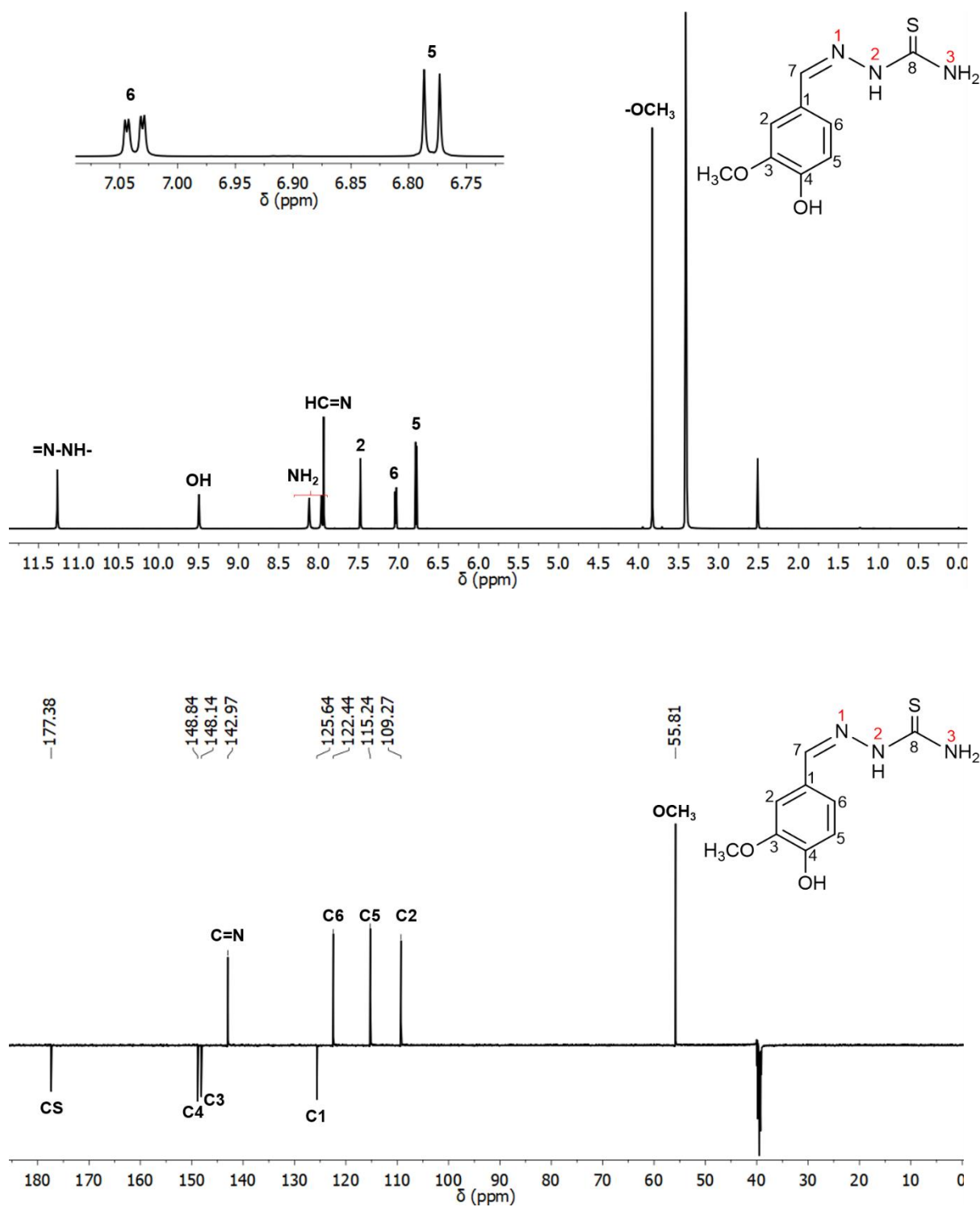
ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, v. 7345, n. 44, p. 4565–4579, 2007.

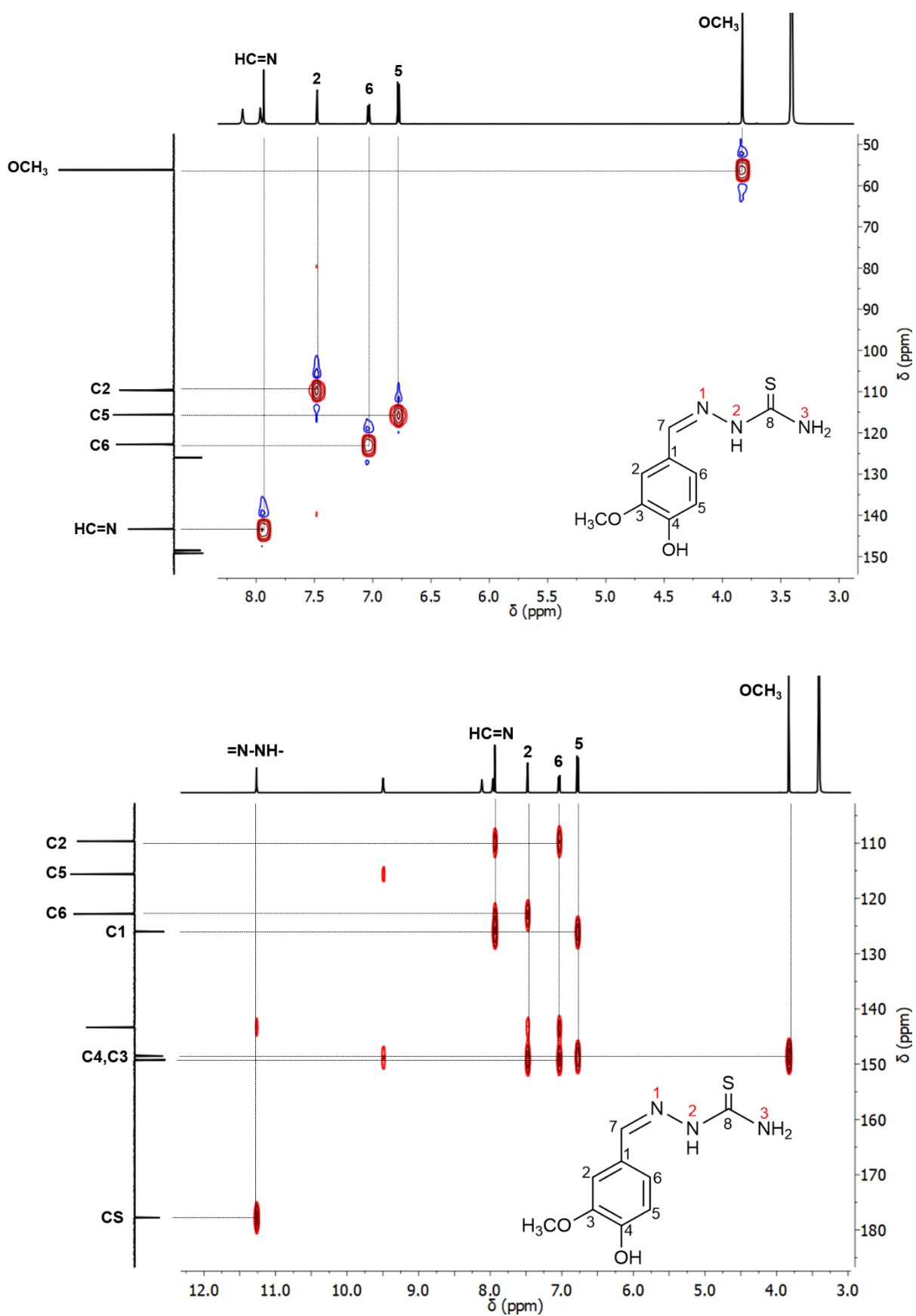
ZENG, L. et al. The development of anticancer ruthenium(II) complexes: From single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 19, p. 5771–5804, 2017.

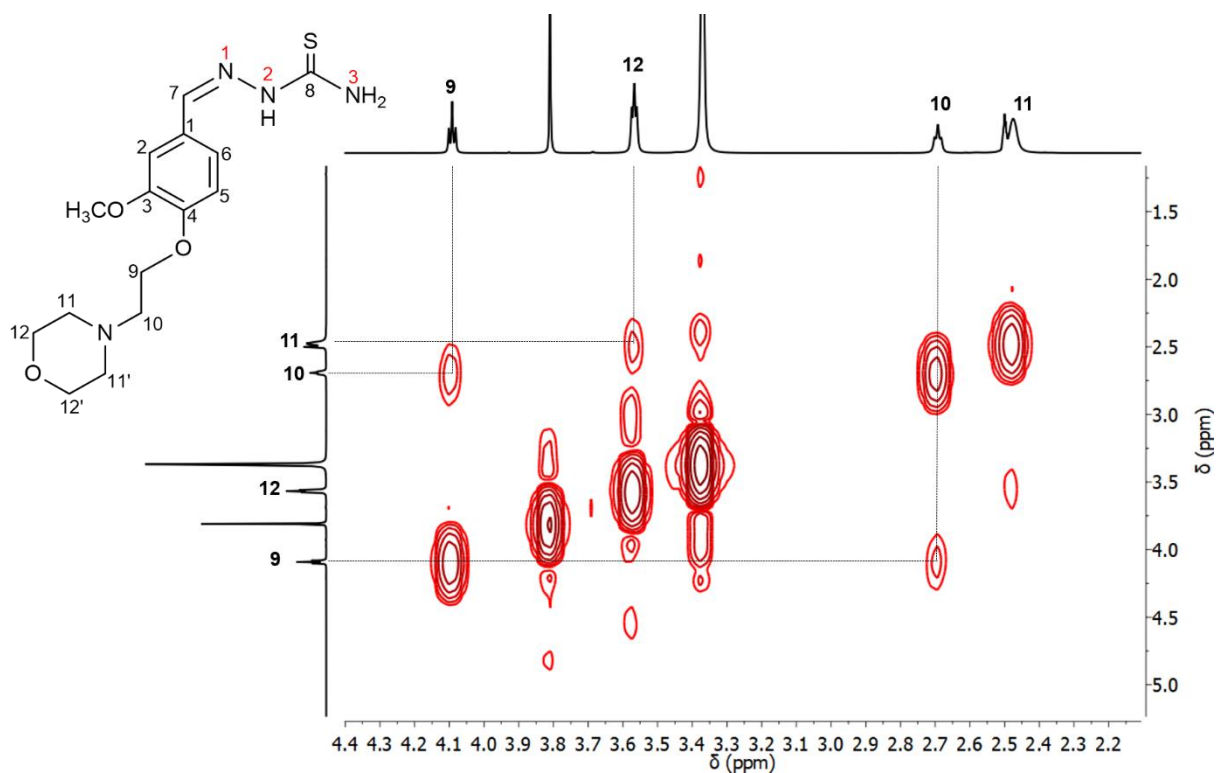
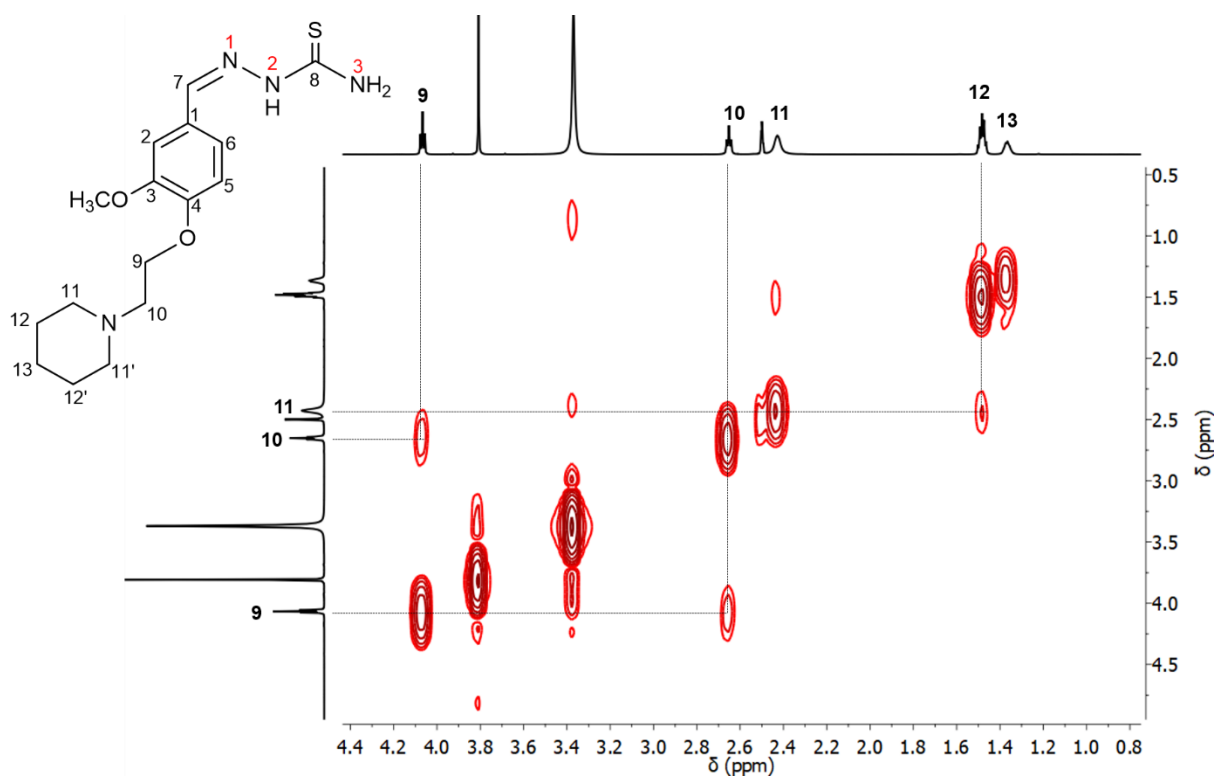
ZHANG, Y.; DAI, M.; YUAN, Z. Methods for the detection of reactive oxygen species. **Analytical Methods**, v. 10, n. 38, p. 4625–4638, 2018.

APÊNDICE

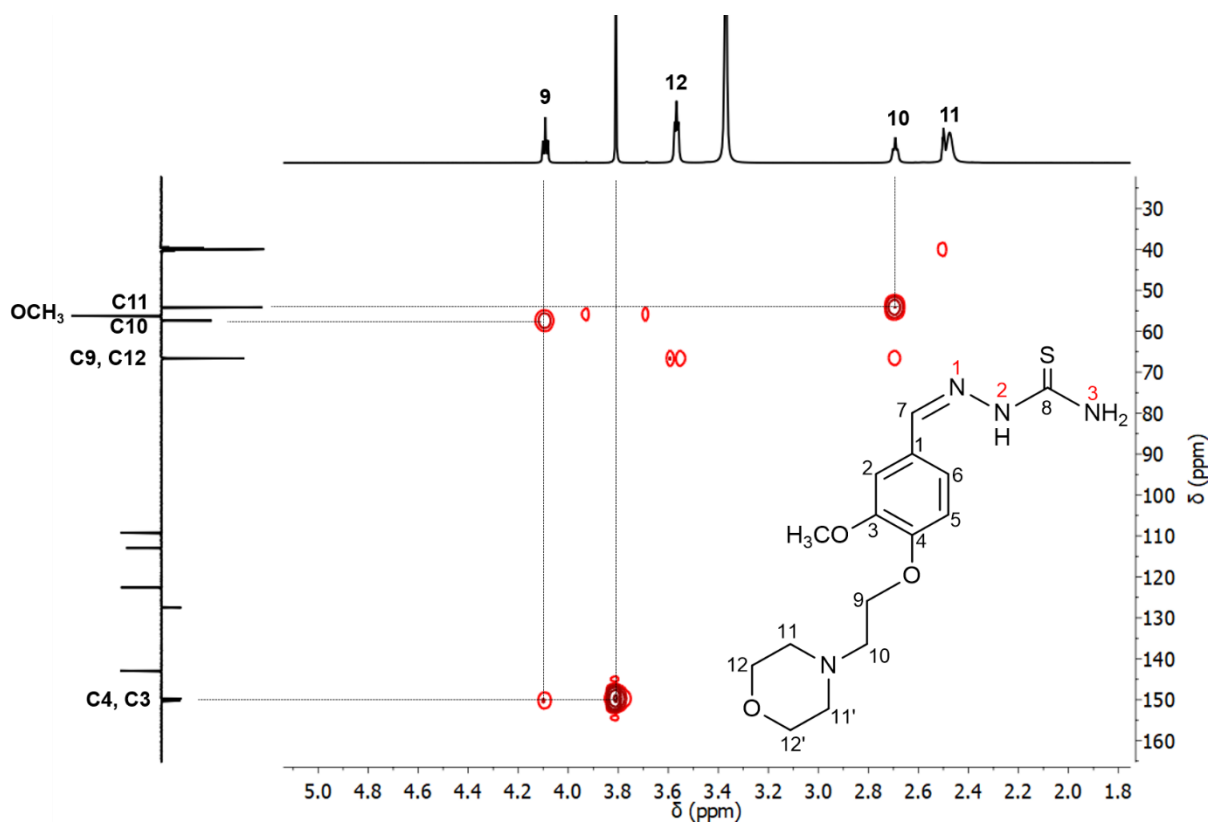
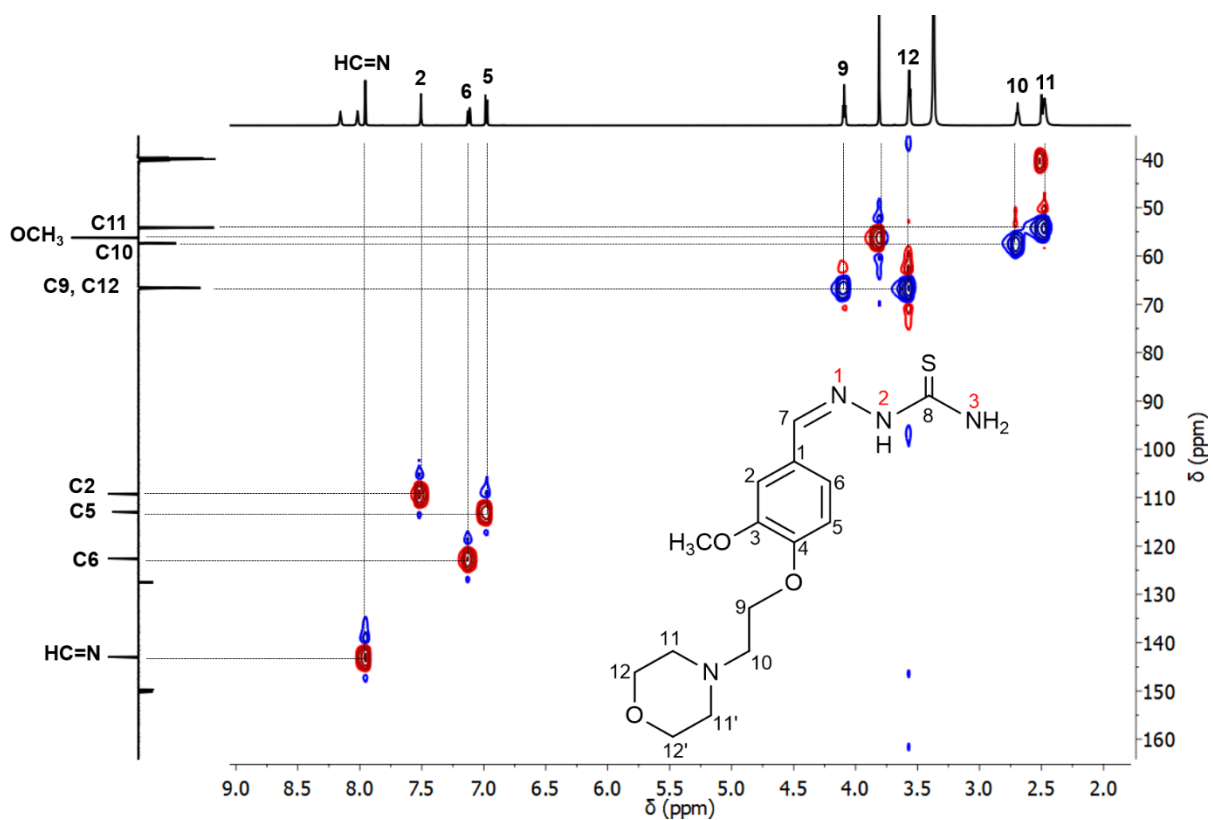
APÊNDICE 1- Espectro de RMN de ^1H e DEPTQ do ligante 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (**L4**) em DMSO-d_6 .

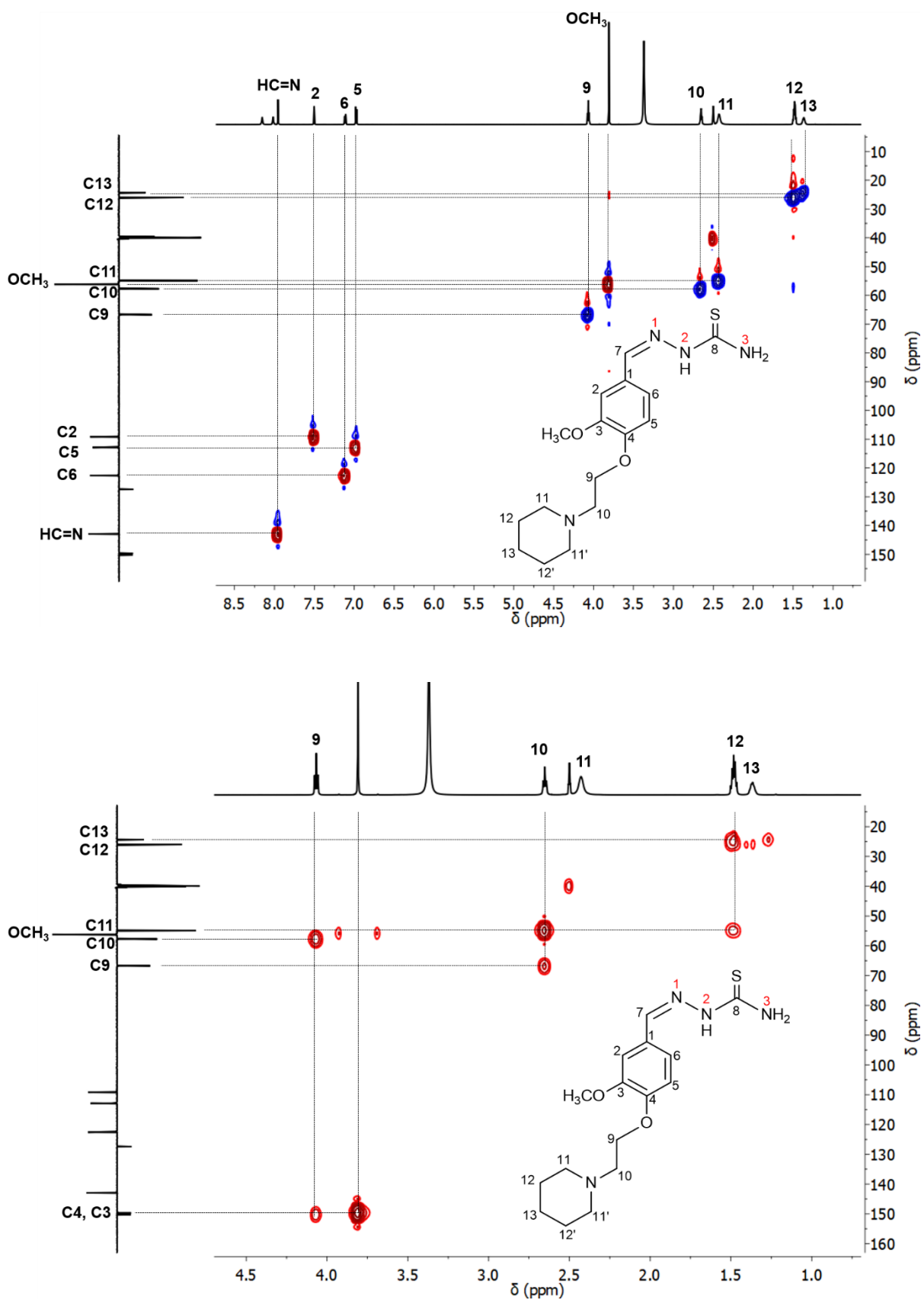


APÊNDICE 2- Mapas de contorno HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C do ligante **L4** em DMSO-d_6 .

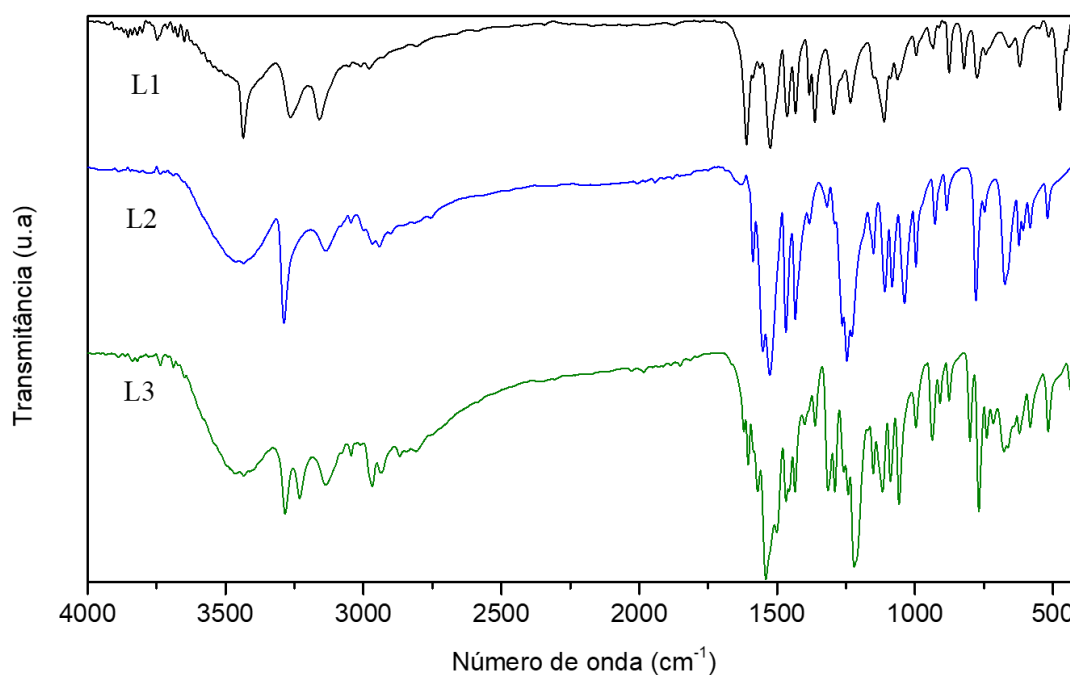
APÊNDICE 3- Espectro de COSY do ligante **L5** em DMSO-d₆.**APÊNDICE 4-** Espectro de COSY do ligante **L6** em DMSO-d₆

APÊNDICE 5- Mapa de contorno HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C do ligante **L5** em DMSO- d_6 .

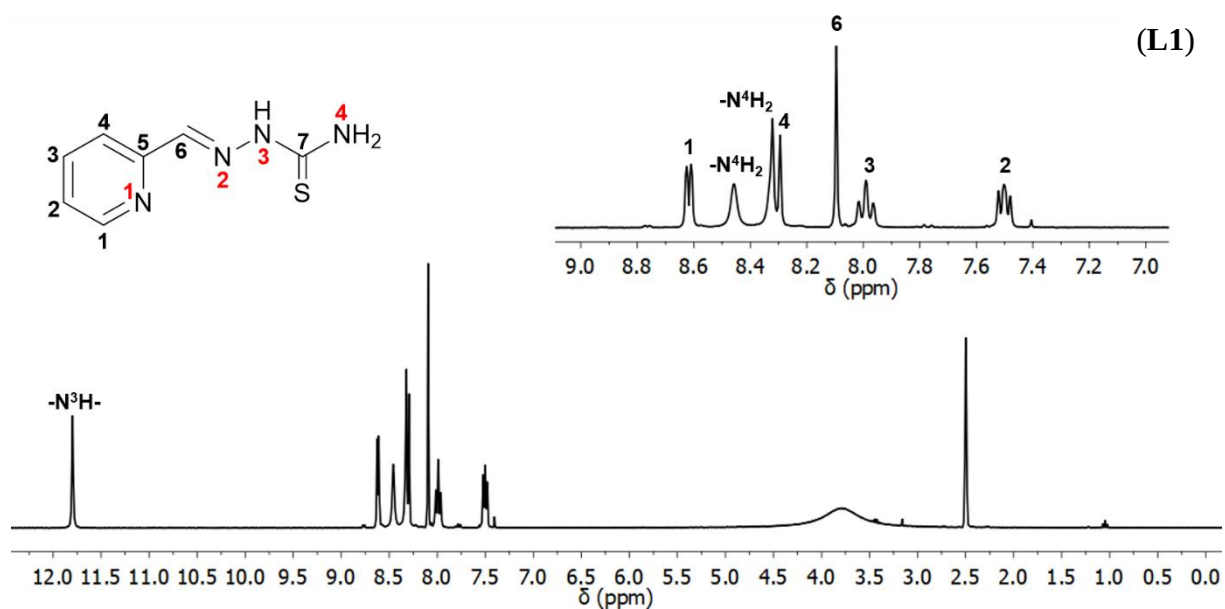


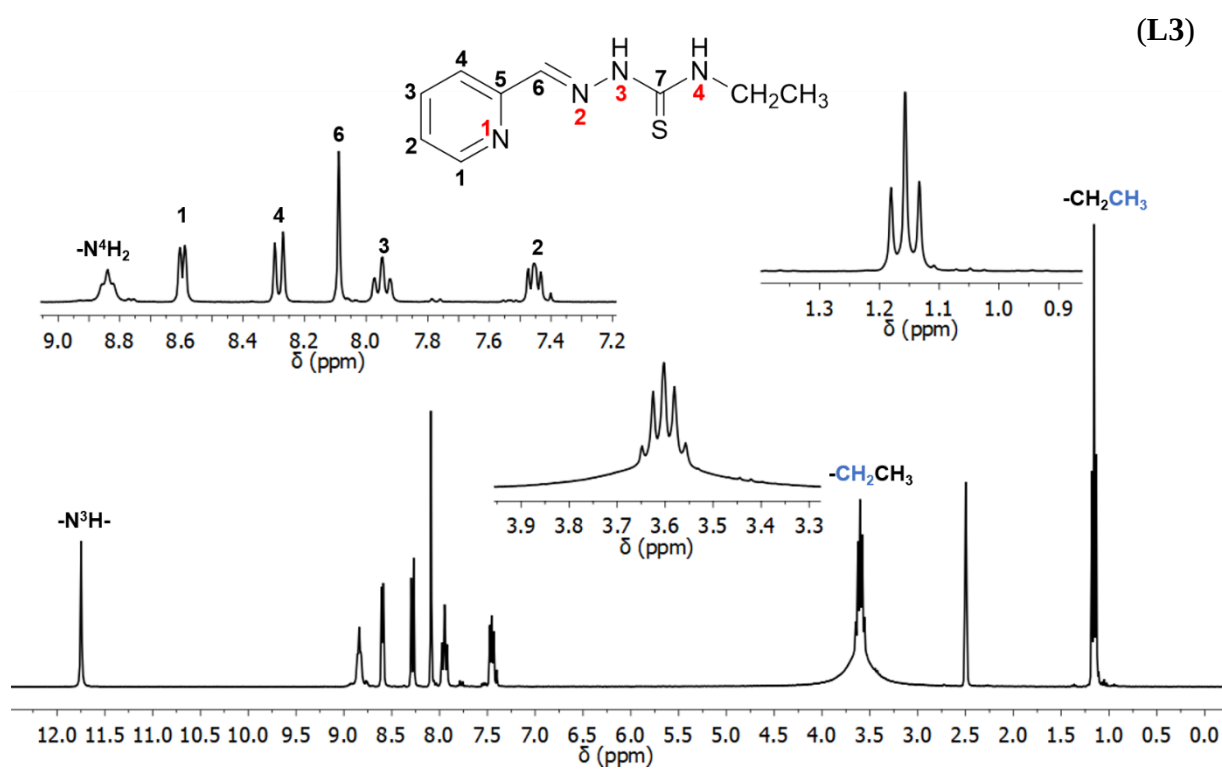
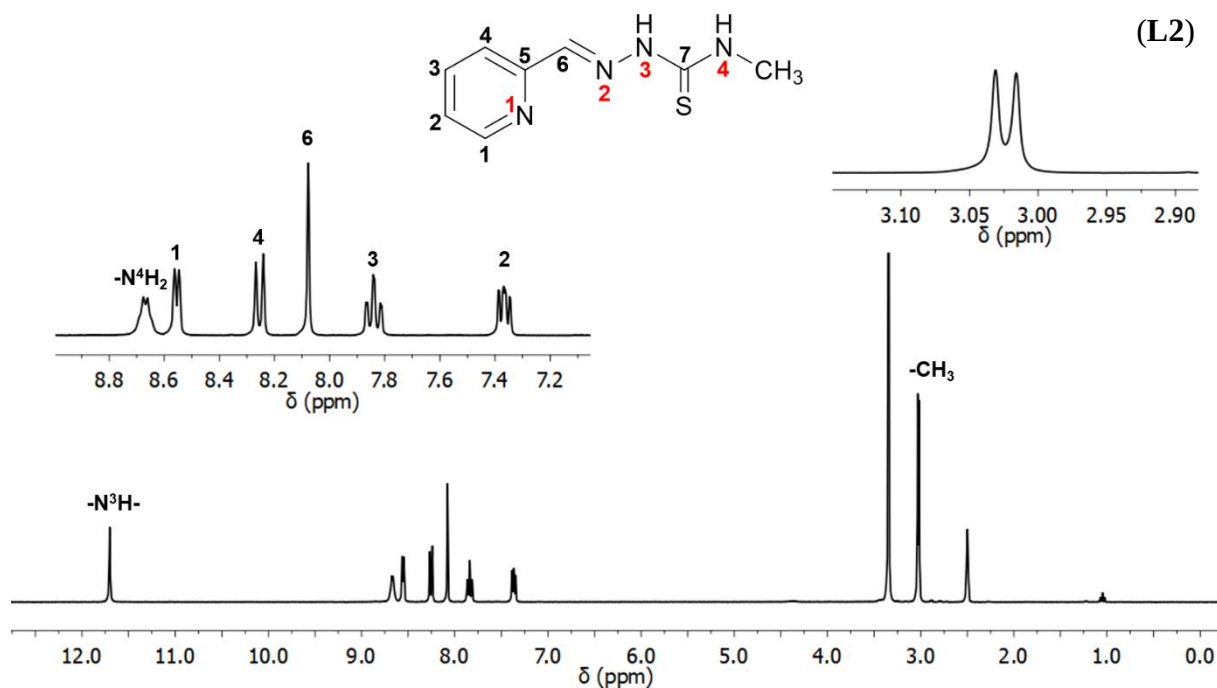
APÊNDICE 6- Mapas de contorno HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C do ligante **L6** em DMSO-d_6 .

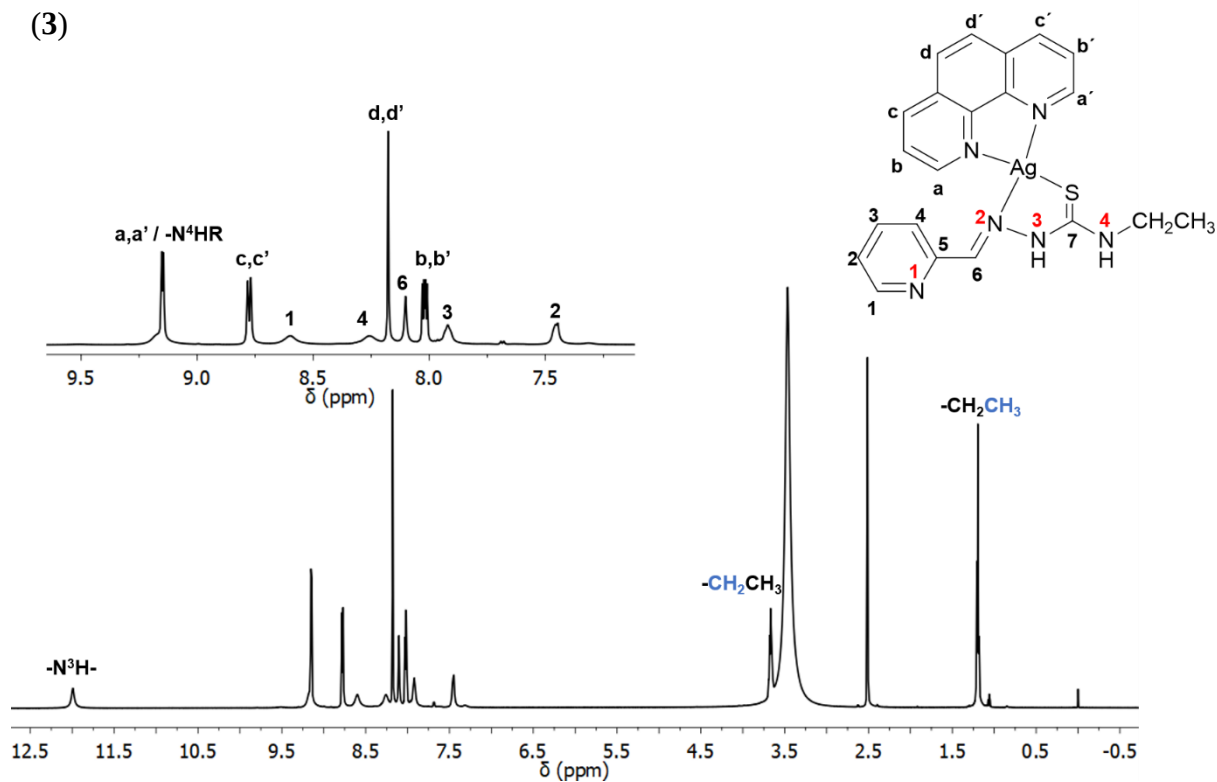
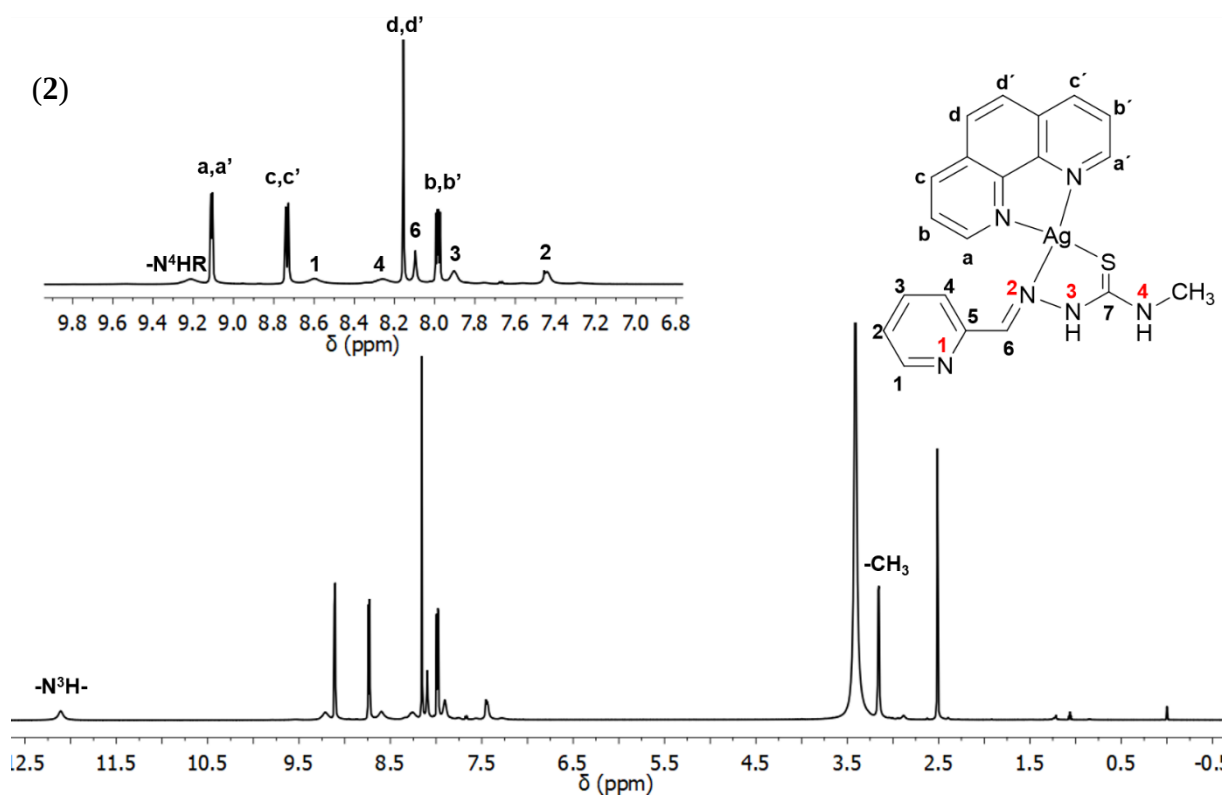
APÊNDICE 7- Espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes tiossemicarbazonas L1-L3 em KBr.

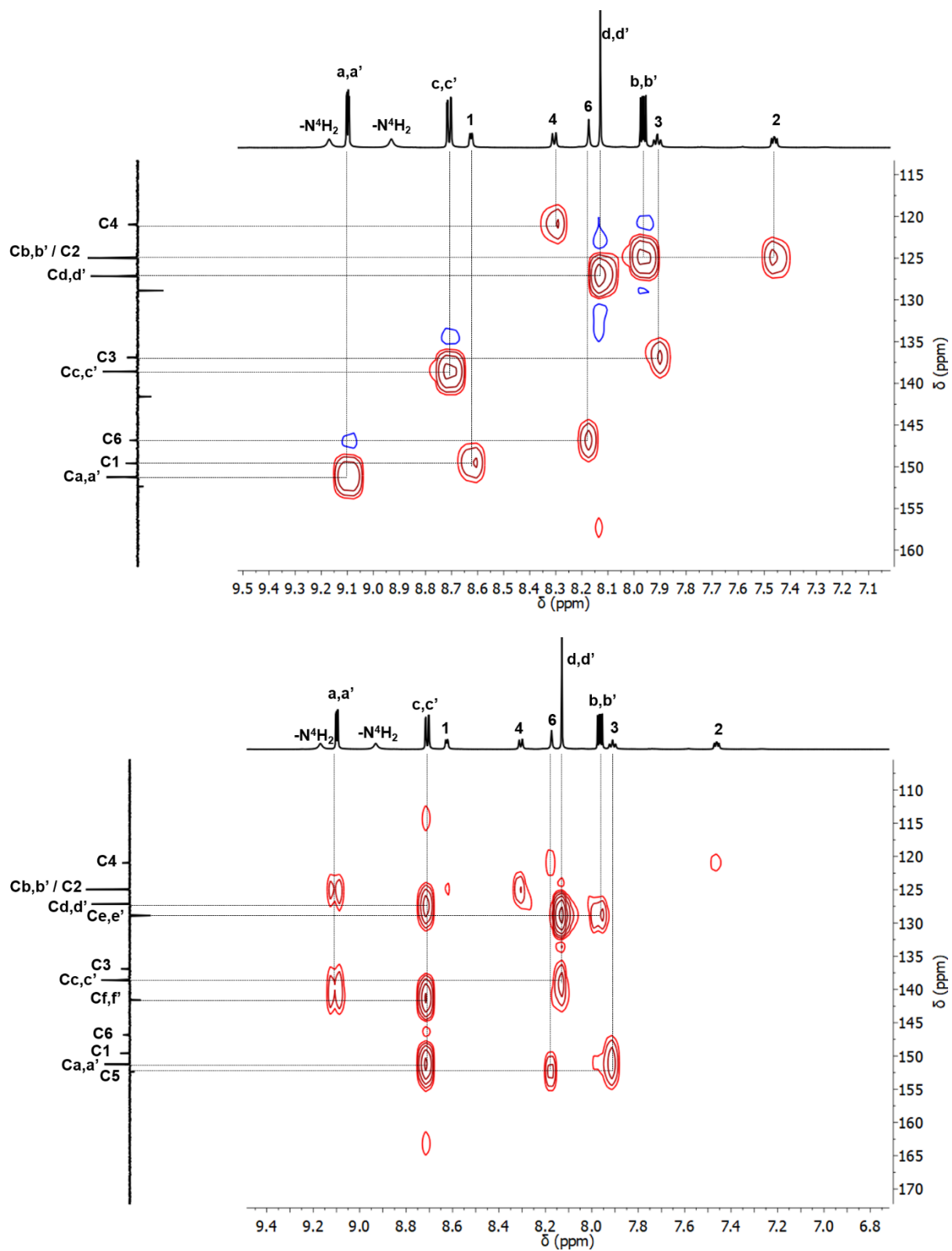


APÊNDICE 8- Espectros de RMN de ^1H dos ligantes 2-formilpiridina tiossemicarbazonas (L1-L3) em DMSO-d_6 .



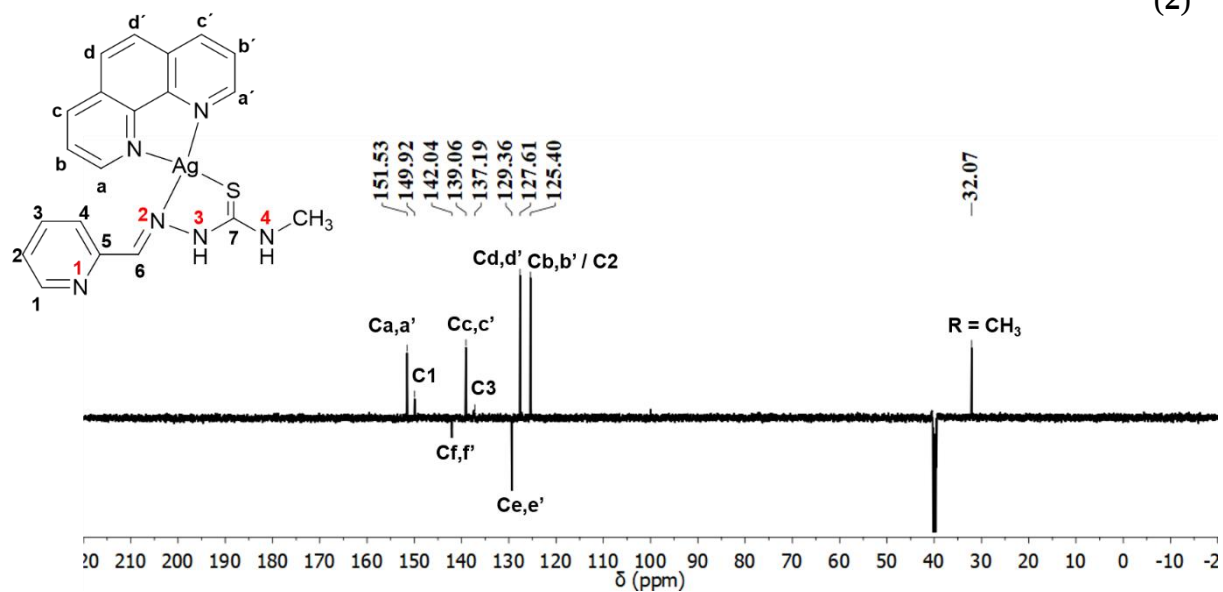


APÊNDICE 9- Espectros de RMN de ^1H dos compostos 2 e 3 em DMSO-d_6 .

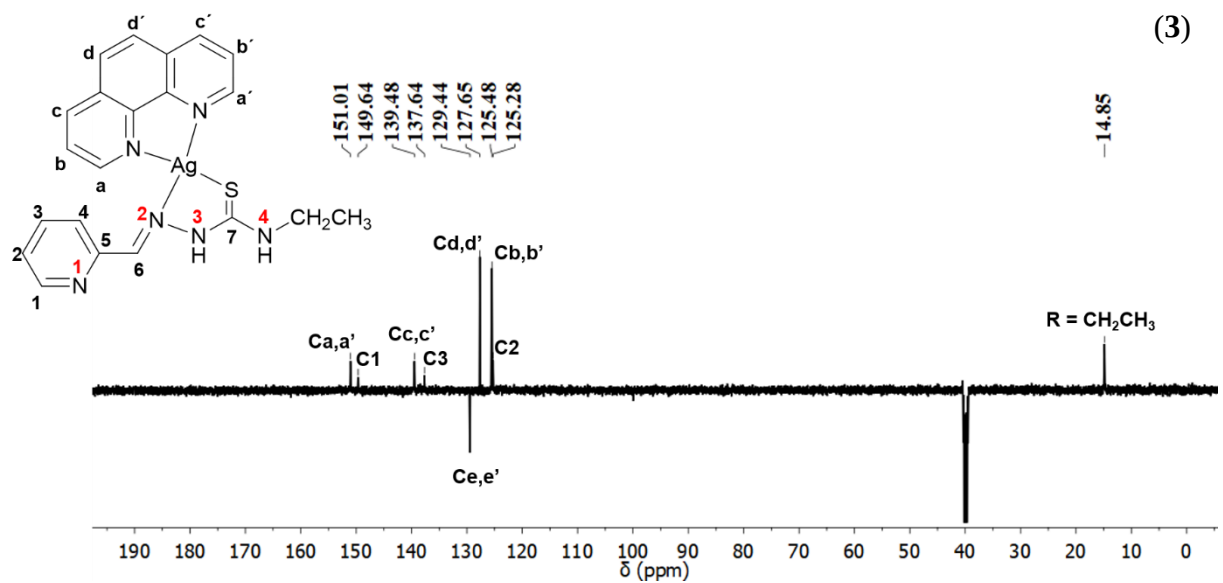
APÊNDICE 10- Mapas de contorno HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C do complexo **1** em DMSO-d_6 .

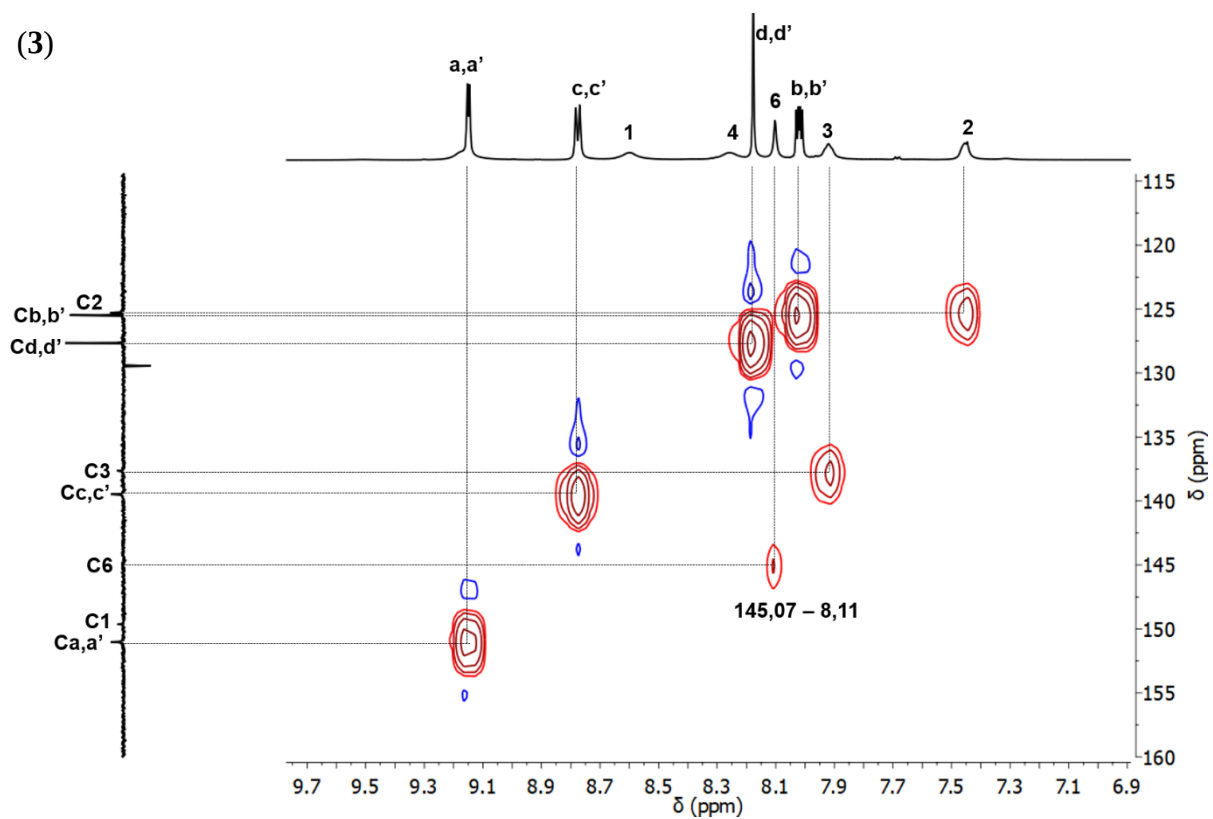
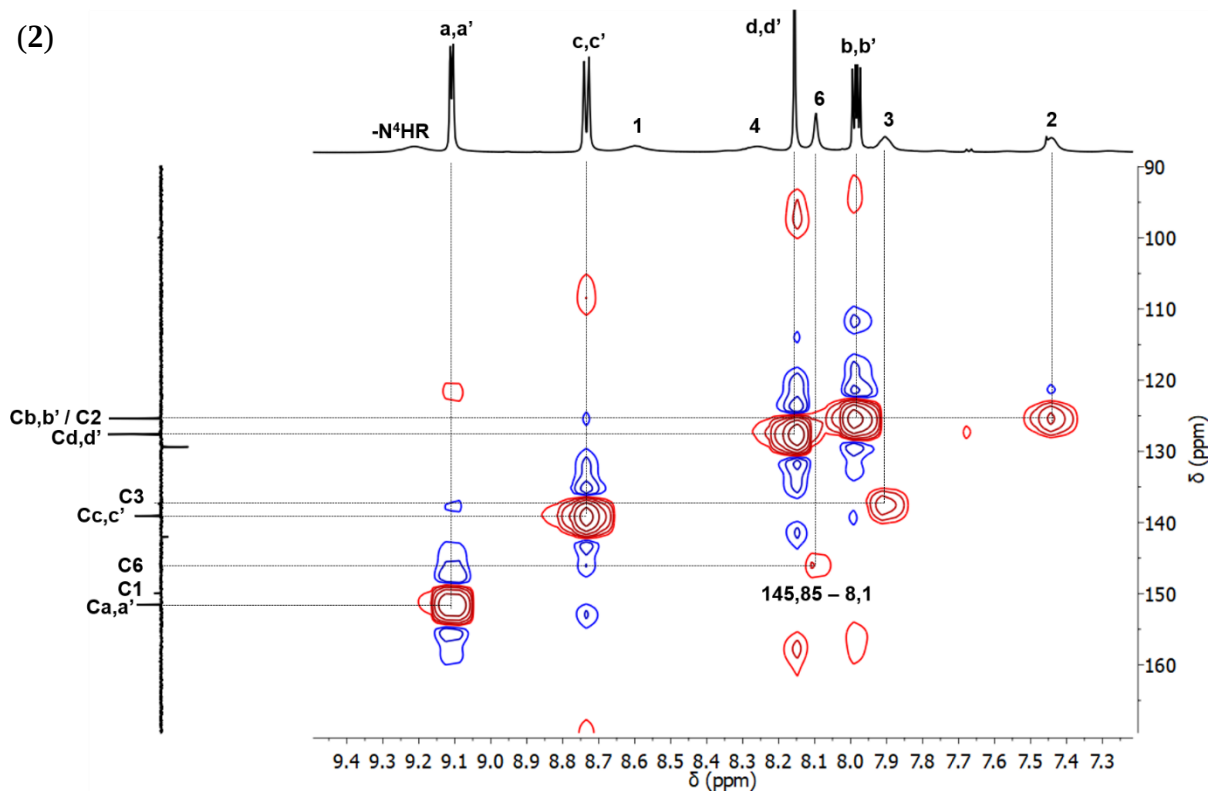
APÊNDICE 11- Espectros de DEPTQ dos compostos 2 e 3 em DMSO-d₆.

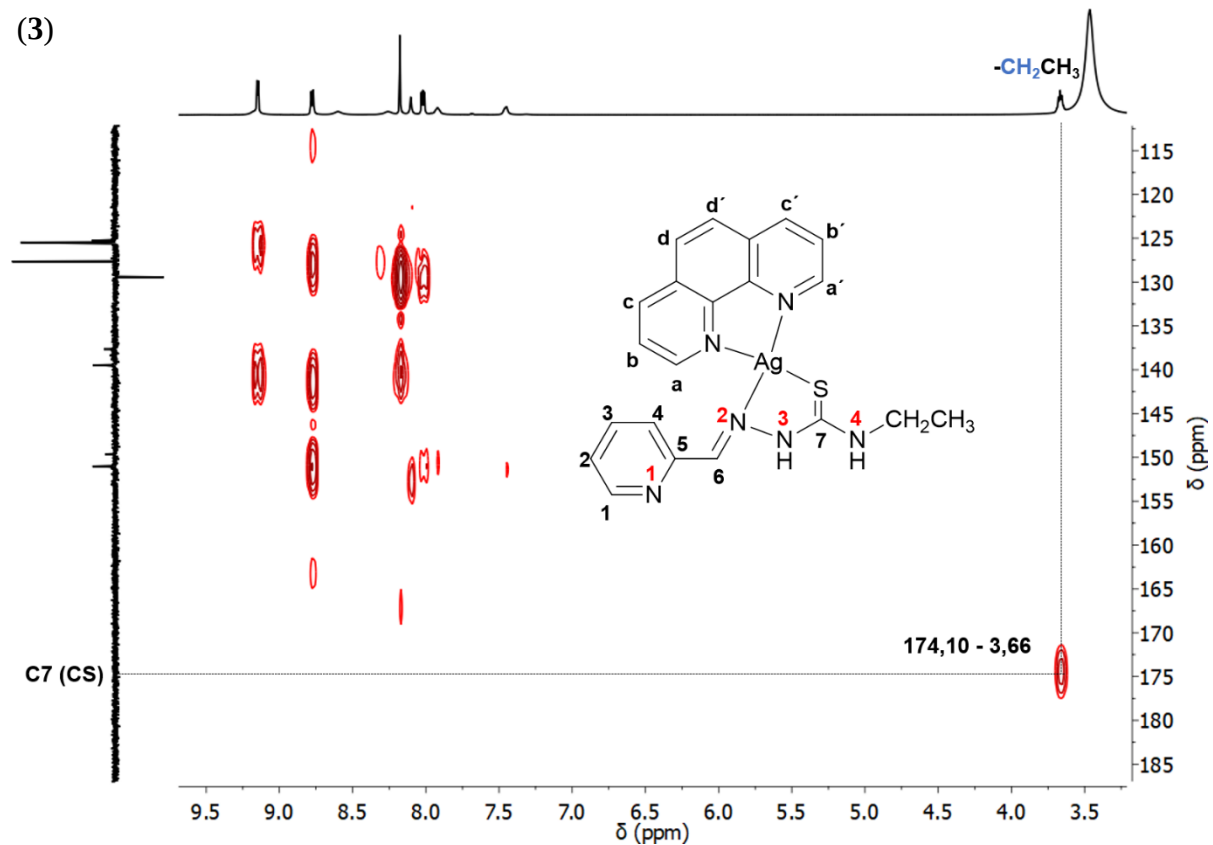
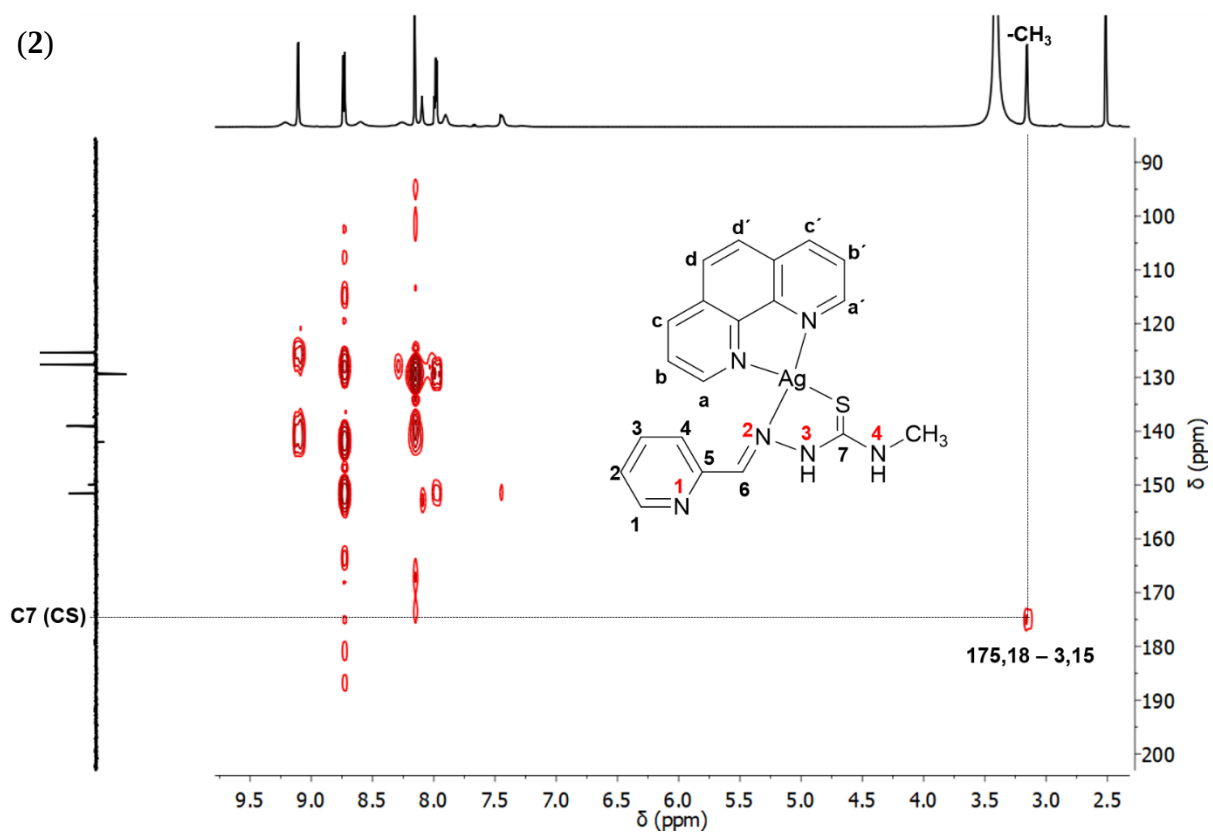
(2)

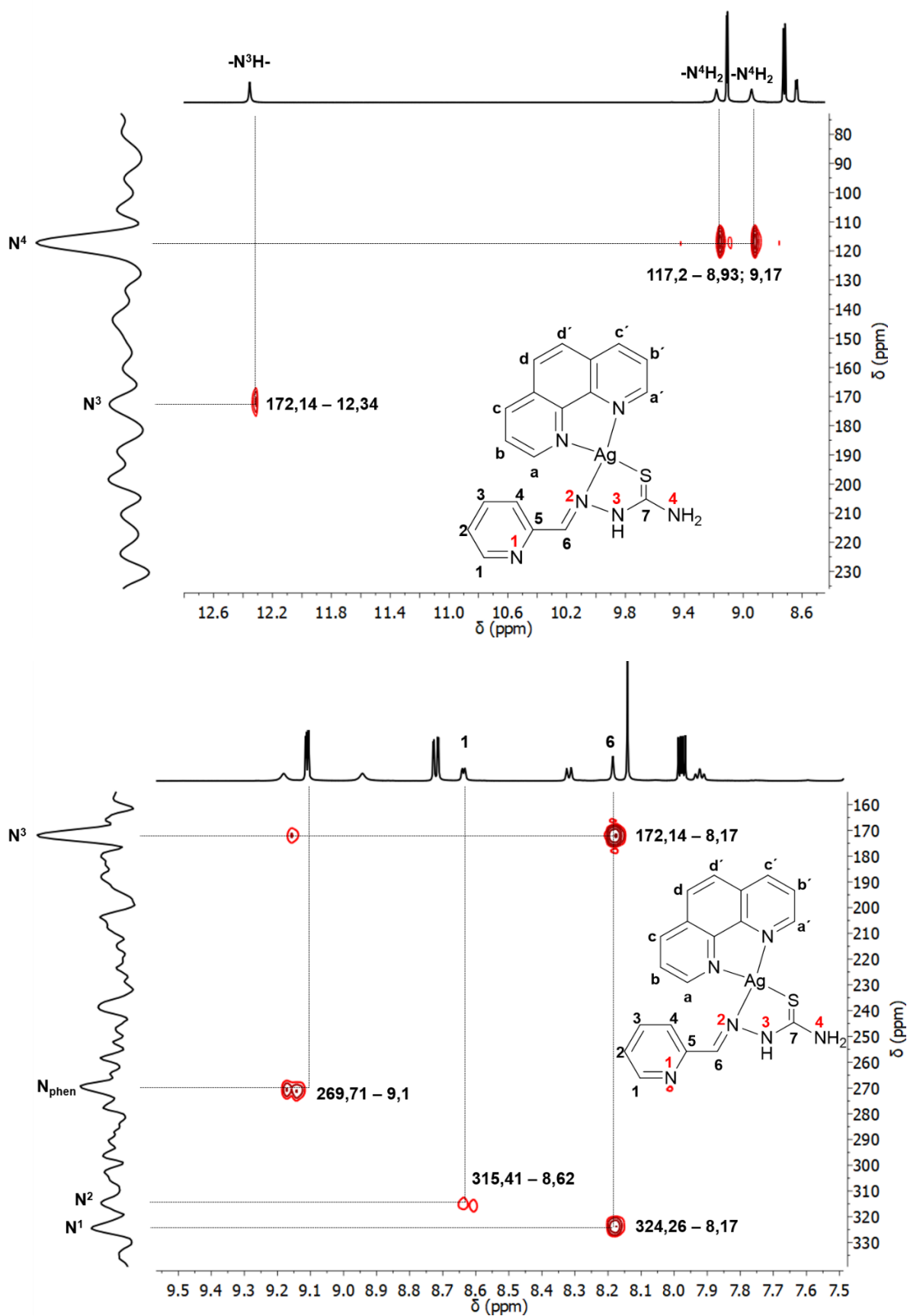


(3)



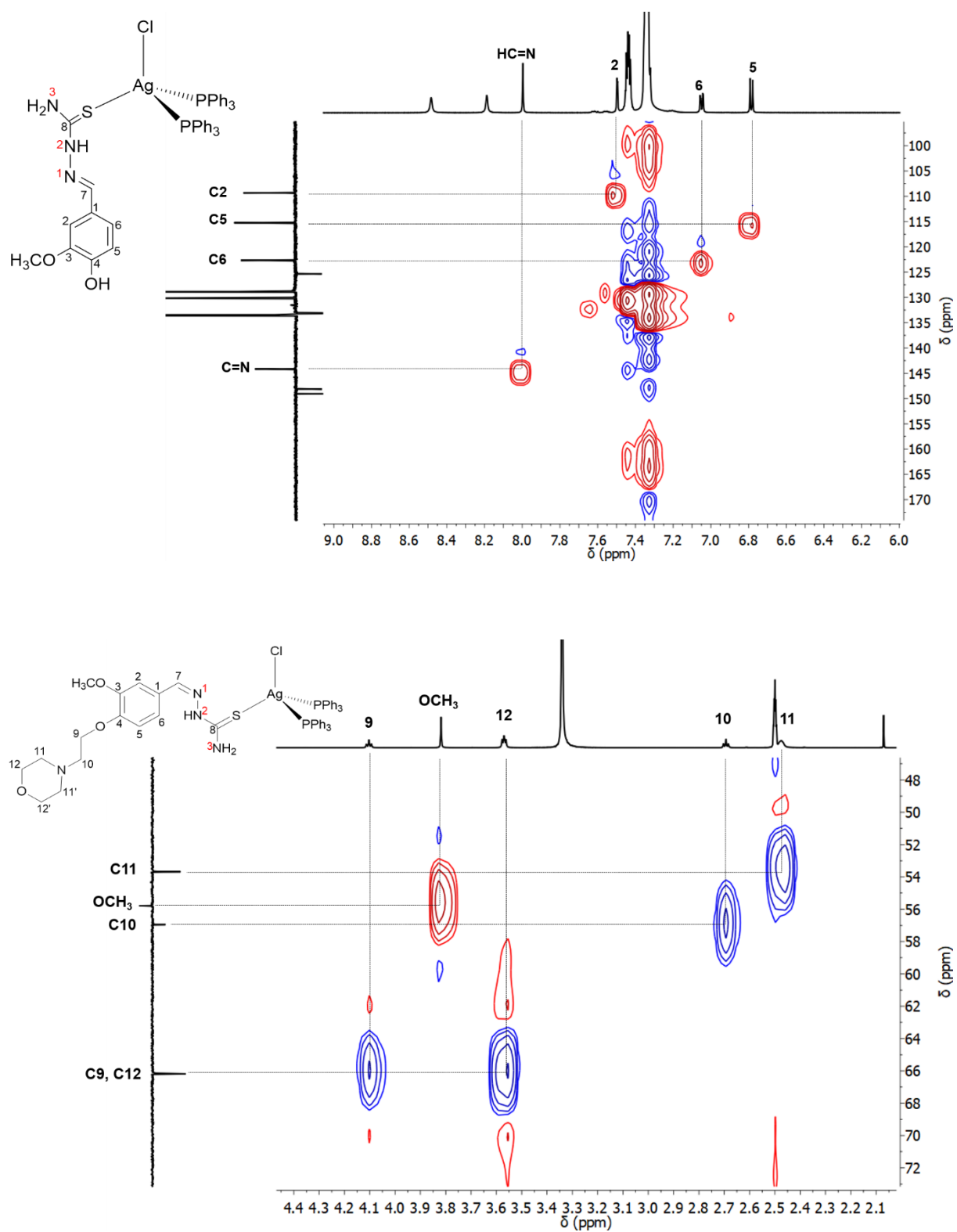
APÊNDICE 12- Mapas de contorno HSQC ^1H - ^{13}C dos compostos **2** e **3** em DMSO- d_6 .

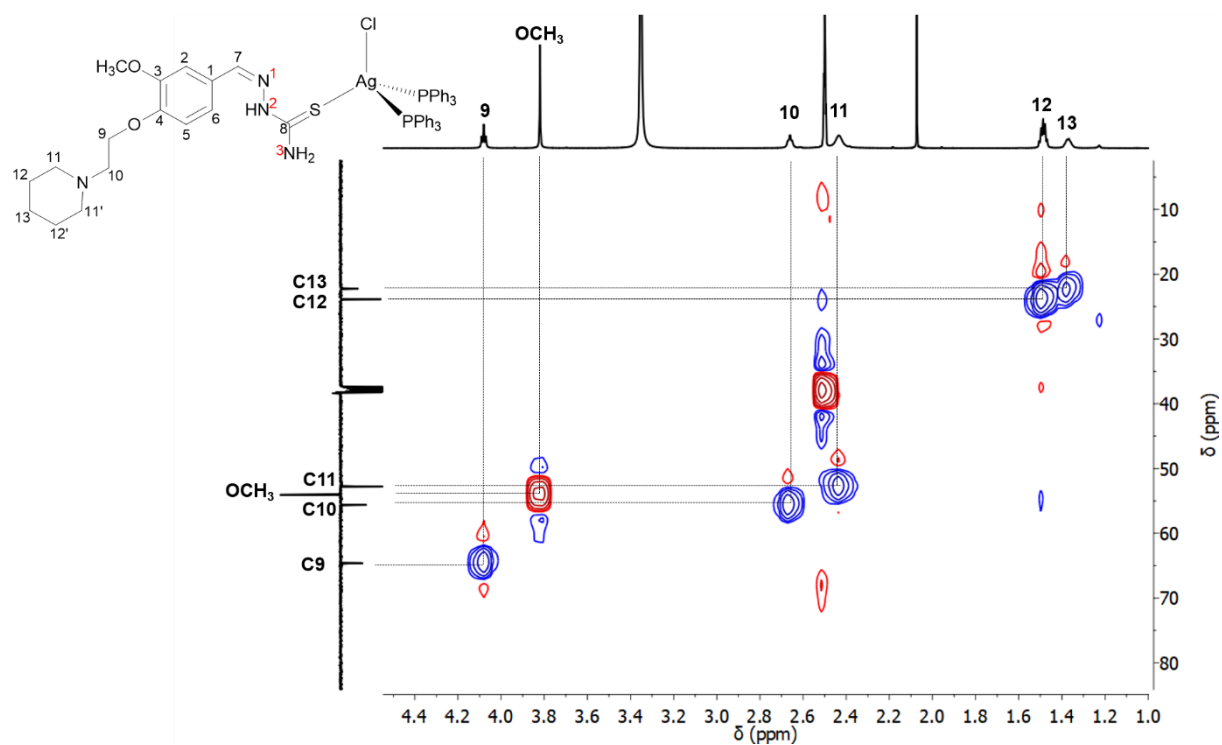
APÊNDICE 13- Mapas de contorno HMBC ^1H - ^{13}C dos compostos 2 e 3 em DMSO- d_6 .

APÊNDICE 14- Mapas de contorno HSQC e HMBC ^1H - ^{15}N do complexo **1** em DMSO-d_6 .

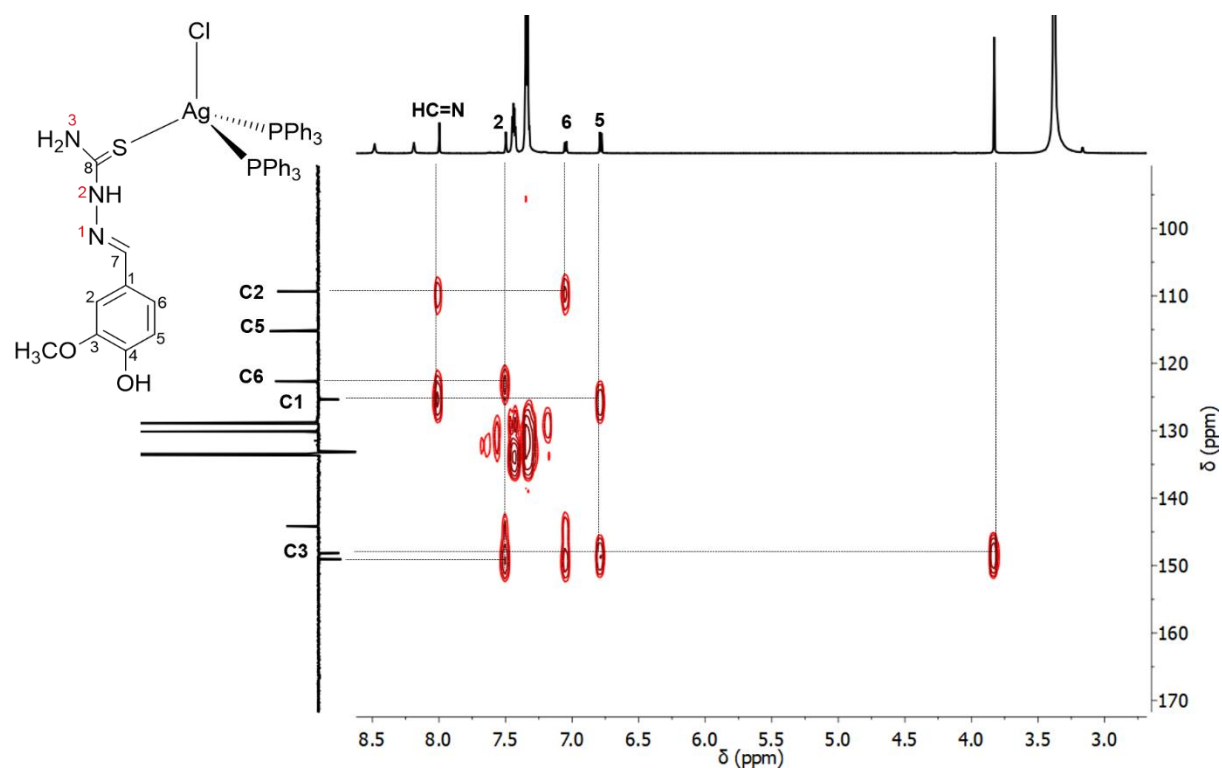
APÊNDICE 15- Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos **5** e **6**.

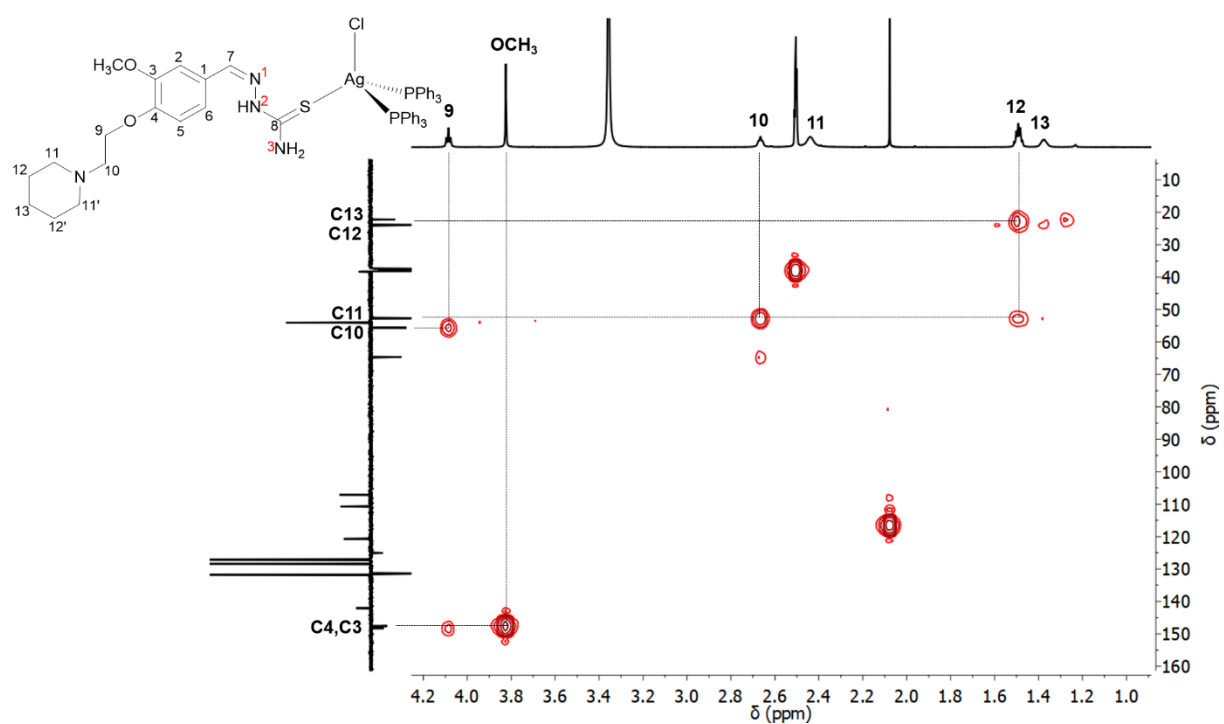
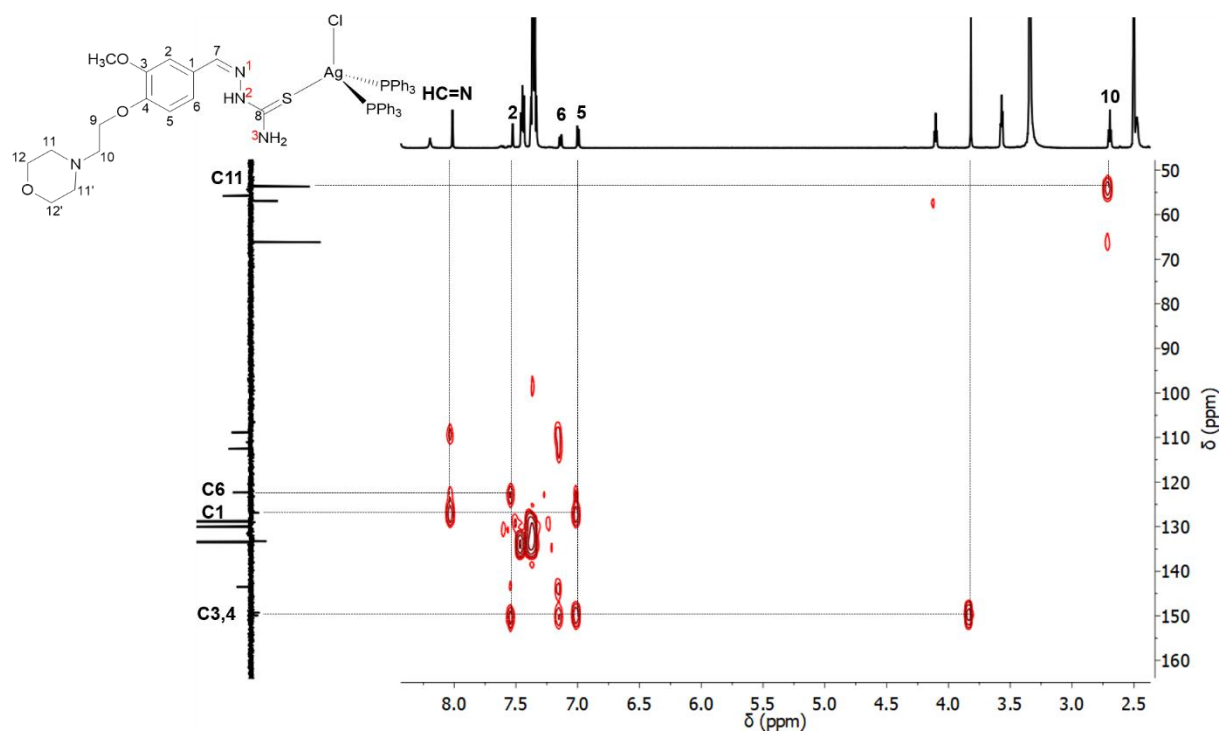
Compostos	5	6
Fórmula mínima	C ₅₁ H ₅₂ AgClN ₄ O ₃ P ₂ S	C ₅₂ H ₅₄ AgClN ₄ O ₂ P ₂ S
Massa molecular	1016,69	974,64
Temperatura (K)	293(2)	298
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	I2/a	I2/a
a (Å)	25,4270(9)	25,5169(10)
b (Å)	12,1243(5)	10,2681(3)
c (Å)	33,2299(10)	43,6410(13)
α (°)	90	90
β (°)	100,785(3)	102,951(3)
γ (°)	90	90
Volume (Å ³)	10063,3(6)	11143,5(7)
Z	8	8
Densidade calculada (g/cm ³)	1,342	1,162
μ (mm ⁻¹)	0,621	0,557
F(000)	4200,0	4016,0
Dimensão do cristal (mm ³)	0,35 × 0,28 × 0,2	0,25 × 0,2 × 0,18
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	MoKα (λ = 0,71073)
Intervalo de Θ (°)	5,03 to 55	5,098 to 68,974
Intervalo de índices	-32 ≤ h ≤ 33, -15 ≤ k ≤ 13, - 42 ≤ l ≤ 43	-31 ≤ h ≤ 39, -14 ≤ k ≤ 15, - 68 ≤ l ≤ 54
Reflexões coletadas	23269	94501
Reflexões únicas	11513 [R _{int} = 0,0257, R _{sigma} = 0,0390]	22366 [R _{int} = 0,0601, R _{sigma} = 0,0670]
Dados/restrições/parâmetros	11513/0/569	22366/0/569
Qualidade de ajuste	1,060	1,010
Índices de R final [I>=2σ (I)]	R ₁ = 0,0366 wR ₂ = 0,0722	R ₁ = 0,0530 wR ₂ = 0,1186
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,0628 wR ₂ = 0,0882	R ₁ = 0,1286 wR ₂ = 0,1488
Maior diferença de pico e buraco/e Å ⁻³	0,45/-0,40	0,83/-0,60
CCDC	1992316	1992321

APÊNDICE 16- Mapas de contorno HSQC ^1H - ^{13}C dos compostos 4–6 em DMSO- d_6 .

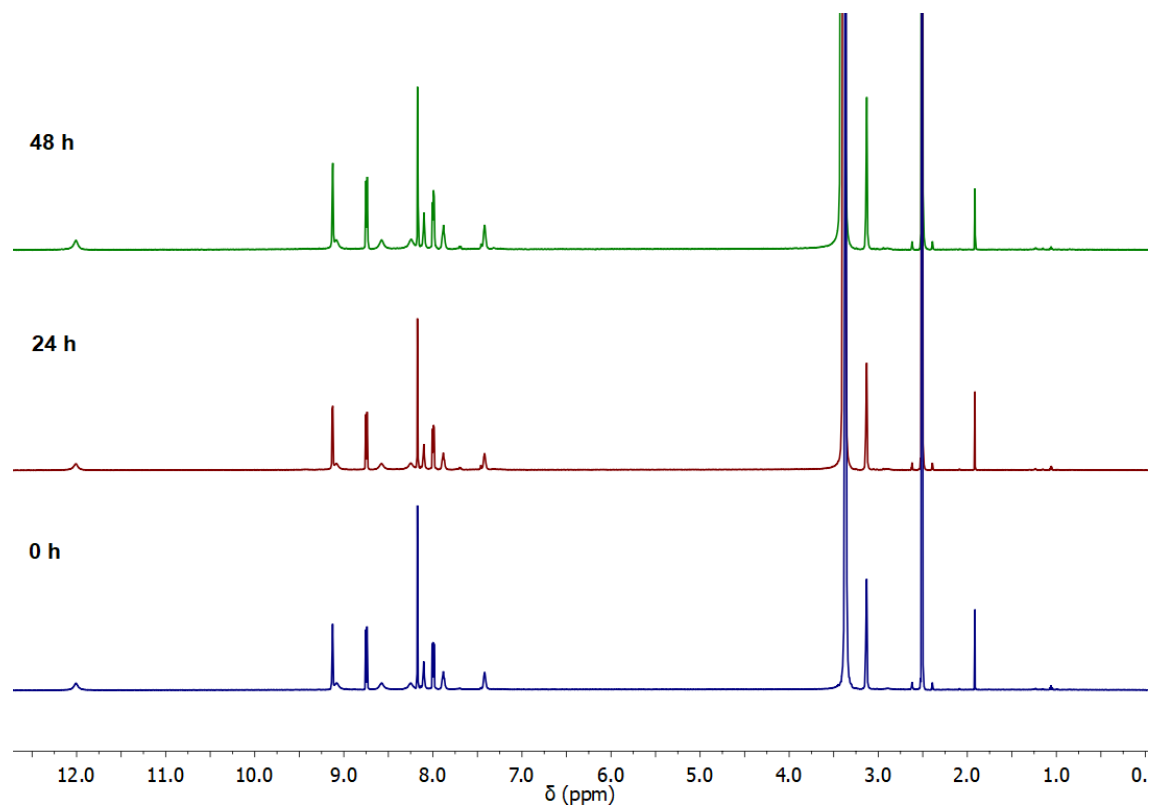


APÊNDICE 17- Mapas de contorno HMBC ¹H-¹³C dos compostos 4-6 em DMSO-d₆.

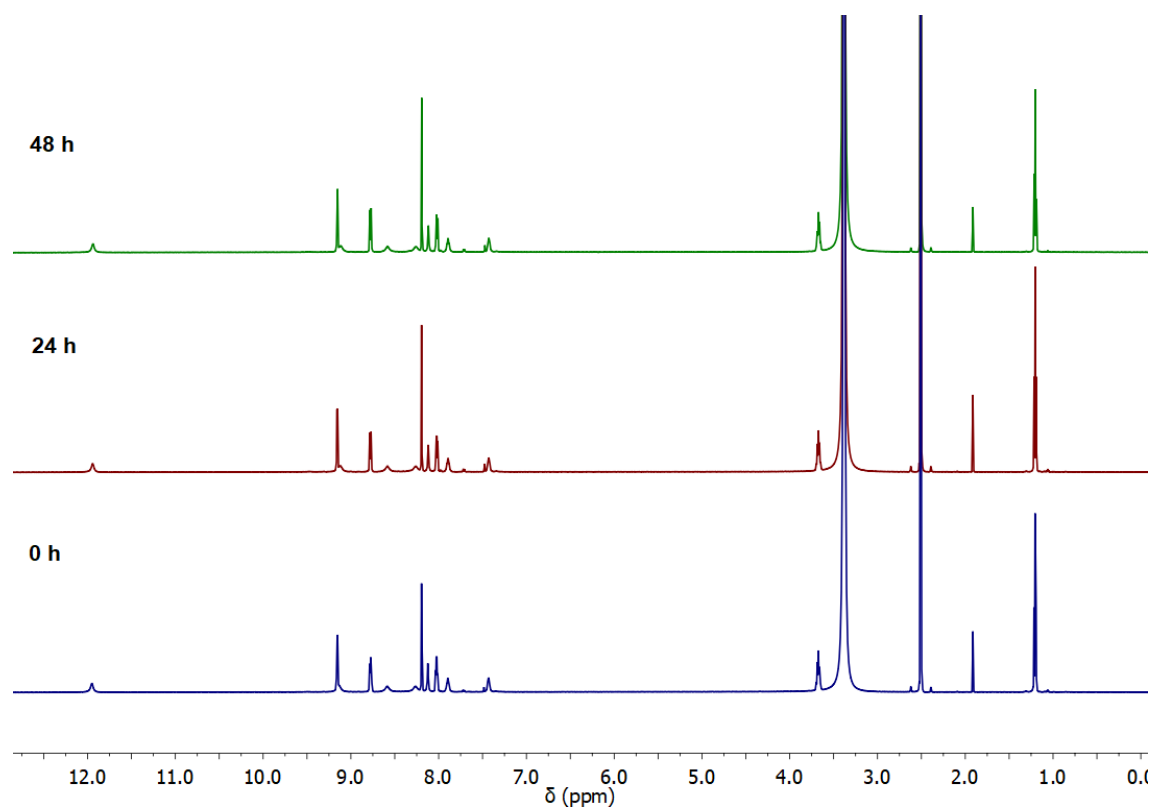




APÊNDICE 18- Espectros de RMN de ^1H dos complexos (A) **2** and (B) **3** em solução de DMSO-d_6 registrados por um período de 48 horas.

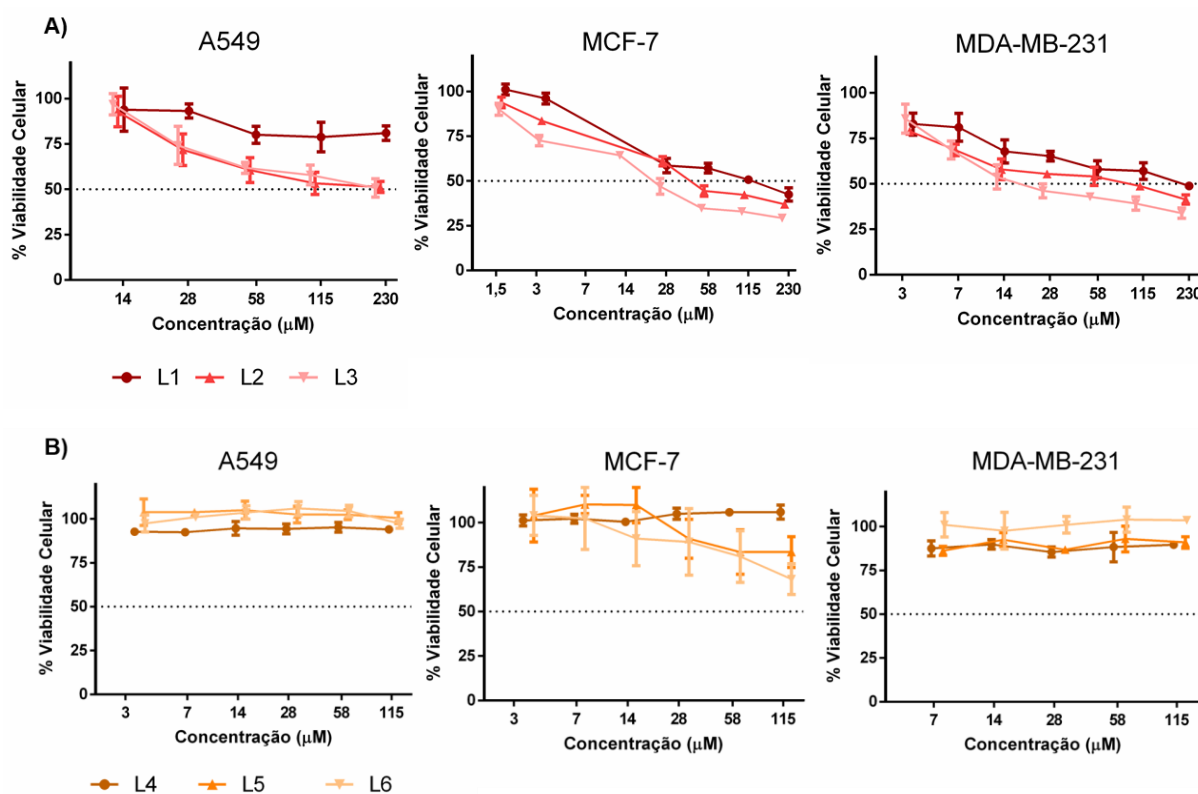


(A)

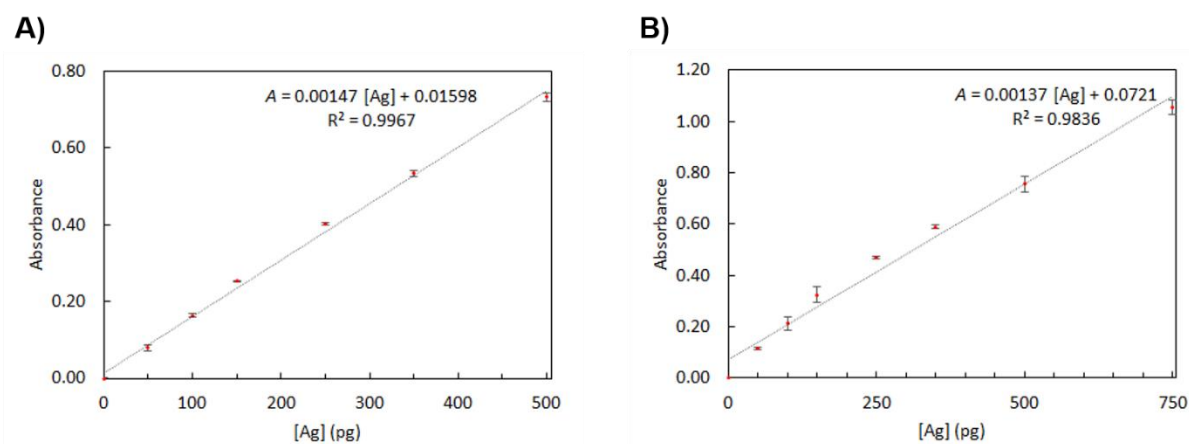


(B)

APÊNDICE 18- Avaliação do efeito citotóxico dos ligantes tiossemicarbazonas. Gráficos de viabilidade celular das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 (mama) e pulmão (A549) após 48 horas de incubação com: **(A)** 2-formilpiridina tiossemicarbazonas; **(B)** vanilina tiossemicarbazonas. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicata.



APÊNDICE 19- Curva de calibração obtida para determinação de Ag por HR-CS GFAAS. Compostos: **A)** $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})]\text{NO}_3$; **B)** $[\text{AgCl}(\text{PPh}_3)_2(\text{L4-L5})]$.



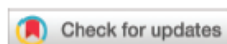
APÊNDICE 20- Porcentagem de internalização de prata nas células tumorais MDA-MB-231 determinada por HR-CS GFAAS (n = 3). **Fonte:** Autor.

Amostra	[Ag] (pg)	Concentração inicial (pg)	Absorção (%)
1	714,8 ± 132	6010,7 ± 489,6	11,9
	730,7 ± 170		12,2
	784,6 ± 224		13,1
2	490,6 ± 116	6318,8 ± 168,9	7,8
	497,4 ± 121		7,9
	415,2 ± 35		6,6
3	1991,7 ± 240	9235,2 ± 779,1	21,6
	1841,5 ± 220		19,9
	1139,0 ± 208		12,3
4	2938 ± 172	9572 ± 119	30,7
	2916 ± 144		30,5
	3004 ± 92		31,4
5	2572 ± 170	7578 ± 211	33,9
	2594 ± 198		34,4
	2480 ± 135		32,7
6	3151 ± 105	8848 ± 408	35,6
	3138 ± 210		35,5
	3028 ± 291		34,2

ANEXOS

Dalton
Transactions

PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)Cite this: *Dalton Trans.*, 2020, **49**,
5264**Cytotoxic and apoptotic effects of ternary silver(I) complexes bearing 2-formylpyridine thiosemicarbazones and 1,10-phenanthroline†**Débora E. S. Silva,^a Amanda B. Becceneri,^b Mariana C. Solcia,^c
João V. B. Santiago,^a Mariete B. Moreira,^a José A. Gomes Neto,^a Fernando R. Pavan,^c
Márcia R. Cominetti,^b José C. M. Pereira^a and Adelino V. G. Netto^a

New silver(I) compounds containing 2-formylpyridine-*N*(4)-*R*-thiosemicarbazones and 1,10-phenanthroline (phen) were synthesized and characterized by spectroscopic techniques (IR and NMR), elemental analysis, ESI-MS and molar conductance measurements. In these complexes, both phen and thiosemicarbazone ligands are coordinated in a chelating bidentate fashion. Compounds **1–3** not only showed good *in vitro* antiproliferative activity against human lung (A549) and breast tumor cells (MDA-MB-231 and MCF-7), with IC₅₀ values ranging from 1.49 to 20.90 μ M, but were also demonstrated to be less toxic towards human breast non-tumor cells (MCF-10A). Cellular uptake studies indicated that compounds **1–3** were taken up by the MDA-MB-231 cells in 6 hours. Cell death assays in the MDA-MB-231 cells were conducted with compound **1** aiming to evaluate its effects on cell morphology, induction of apoptosis, the cell cycle, reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). Compound **1** caused morphological changes, such as cell shrinkage and rounding, increased the sub-G1 phase population, and induced apoptotic cell death, ROS formation and loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). DNA binding results revealed that **1** interacted with the ct-DNA minor groove. Complexes **1–3** also exhibited good *in vitro* activity against *M. tuberculosis* H37Rv, with MIC values ranging from 3.37 to 4.65 μ M.

Received 22nd January 2020,
Accepted 20th March 2020
DOI: 10.1039/d0dt00253d
rsc.li/dalton



Cite this: DOI: 10.1039/d0dt01134g

Silver(I) complexes of 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones and triphenylphosphine: structural, cytotoxicity, and apoptotic studies†

Débora E. S. Silva,^a Amanda B. Becceneri,^b João V. B. Santiago,^a José A. Gomes Neto,^a Javier Ellena,^c Márcia R. Cominetti,^b José C. M. Pereira,^a Michael J. Hannon^d and Adelino V. G. Netto^{a*}

Novel silver(I) complexes of the type $[AgCl(PPh_3)_2(L)]$ (PPh_3 = triphenylphosphine; L = VTSC = 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone (**1**); VMTSC = 3-methoxy-4-[2-(morpholine-1-yl)ethoxy]benzaldehyde thiosemicarbazone (**2**); VPTSC = 3-methoxy-4-[2-(piperidine-1-yl)ethoxy]benzaldehyde thiosemicarbazone (**3**)) were synthesized and fully characterized by spectroscopic techniques. The molecular structures of complexes **2** and **3** were determined by single crystal X-ray diffraction. Compounds **1–3** exhibited appreciable cytotoxic activity against human tumor cells (lung A549, breast MDA-MB-231 and MCF-7) with IC_{50} values in 48 h of incubation ranging from 5.6 to 18 μ M. Cellular uptake studies showed that complexes **1–3** were efficiently internalized after 3 hours of treatment in MDA-MB-231 cells. The effects of complex **1** on the cell morphology, cell cycle, induction of apoptosis, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), and reactive oxygen species (ROS) production have been evaluated in triple negative breast cancer (TNBC) cells MDA-MB-231. Our results showed that complex **1** induced typical morphological alterations of cell death, an increase in cells at the sub-G1 phase, apoptosis, and mitochondrial membrane depolarization. Furthermore, DNA binding studies evidenced that **1** can bind to ct-DNA and does so without modifying the B-structure of the DNA, but that the binding is weak compared to that of Hoechst 33258.

Received 25th March 2020,
Accepted 17th August 2020
DOI: 10.1039/d0dt01134g
rsc.li/dalton