

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FÍSICO-QUÍMICA E INORGÂNICA

Ana Beatriz Lazzarini

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA E DA INTERAÇÃO COM O DNA DE UM NOVO
COMPOSTO DE PRATA(I) CONTENDO 1,10-FENANTROLINA E A
TIOSEMICARBAZONA DERIVADA DO CINAMALDEÍDO**

ARARAQUARA

2022

ANA BEATRIZ LAZZARINI

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA E DA INTERAÇÃO COM O DNA DE UM NOVO
COMPOSTO DE PRATA(I) CONTENDO 1,10-FENANTROLINA E A
TIOSEMICARBAZONA DERIVADA DO CINAMALDEÍDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Co-orientador: Dr. Cauê Benito Scarim

ARARAQUARA

2022

L432s

Lazzarini, Ana Beatriz

Síntese, caracterização, investigação da atividade antiproliferativa e da interação com o DNA de um novo composto de prata(I) contendo 1,10-fenantrolina e a tiossemicarbazona derivada do cinamaldeído / Ana Beatriz Lazzarini. -- Araraquara, 2022

88 f. : il.

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

Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Cauê Benito Scarim

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E DA INTERAÇÃO COM O DNA DE UM NOVO COMPOSTO DE PRATA (I) CONTENDO 1,10-FENANTROLINA E A TIOSSEMICARBAZONA DERIVADA DO CINAMALDEÍDO "

AUTORA: ANA BEATRIZ LAZZARINI

ORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO

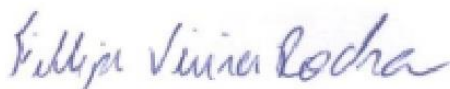
COORIENTADOR: CAUÊ BENITO SCARIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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. Dr. FILLIPE VIEIRA ROCHA (Participação Virtual)

Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCar - São Carlos



Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA (Participação Virtual)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 12 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Ana Beatriz Lazzarini

Nome em citações bibliográficas: LAZZARINI, A. B.

Endereço profissional: Departamento de Analítica, Físico-Química e Inorgânica, Instituto de Química UNESP Araraquara.

Av. Prof. Francisco Degni, nº 55, Jardim Quitandinha, Araraquara, SP, Brasil.

CEP: 14800-900.

Endereço eletrônico: bia.lazzarini@hotmail.com / ana.lazzarini@unesp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2020 – 2022 Mestrado Acadêmico em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Química UNESP Araraquara.

Projeto: Síntese, caracterização, investigação da atividade antiproliferativa e da interação com o DNA de um novo composto de prata(I) contendo 1,10-fenantrolina e a tiossemicarbazona derivada do cinamaldeído.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Co-orientador: Dr. Cauê Benito Scarim

Bolsista: CNPq

2016 – 2019 Bacharelado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Química UNESP Araraquara.

Projeto: Novos complexos de paládio(II) contendo tiossemicarbazonas: citotoxicidade, estudos de interação com proteínas e avaliação do potencial antitumoral.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Supervisor Científico: Renan Lira de Farias

Bolsista: PIBIC, CNPq

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021 Estagiária à Docência na disciplina "Química Inorgânica Descritiva" do curso de Bacharelado em Química.

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

2021 Curso de Alemão II

Centro de Línguas e Desenvolvimento de Professores (CLDP), Faculdade de Ciências e Letras (FCL), UNESP Araraquara

Carga Horária: 36h

2021 Curso de Alemão I

Centro de Línguas e Desenvolvimento de Professores (CLDP), Faculdade de Ciências e Letras (FCL), UNESP Araraquara

Carga Horária: 36h

2019 Iniciação Científica em Química Inorgânica Medicinal.

Projeto: Novos complexos de paládio(II) contendo tiossemicarbazonas: citotoxicidade, estudos de interação com proteínas e avaliação do potencial antitumoral

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

Bolsista: PIBIC, CNPq

2019 Monitora na disciplina "Espectroanalítica" do curso de Bacharelado em Química.

Docente responsável: Prof^a Dr^a Edilene Cristina Ferreira.

2017-2018 Iniciação Científica.

Área de estudo: Espectroscopia eletrônica de compostos de coordenação: terras raras e metais da 1^a série de transição

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim.

2017 Monitora na disciplina "Química Fundamental" do curso de Bacharelado em Química.

Docente responsável: Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim.

PRÊMIOS E TÍTULOS

2021 Proficiente em inglês pelo TOEFL ITP, Educational Testing Service (CEFR level B2).

2015 Proficiente em inglês pelo First Certificate in English (FCE), Cambridge English Language Assessment (CEFR level B1).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. **LAZZARINI, A. B.**; SAMPAIO, C. P.; GONCALVES, V. S.; NASCIMENTO, E. R. F.; PEREIRA, F. M. V.; FRANCA, V. V. Mulheres Na Ciência: papel da educação sem desigualdade de gênero. **Revista Ciência Em Extensão**, 14(2), p. 188-194, 2018.

Apresentação de trabalhos em eventos científicos

1. **LAZZARINI, A. B.**; LIMA, A. A.; ZANETTI, R. D.; NETTO, A. V. G. Synthesis, characterization, and DNA binding studies of cinnamaldehyde thiosemicarbazone silver(I) complex. 2022. (8th Latin American Symposium on Coordination and Organometallic Chemistry).
2. CARLO, D. M.; **LAZZARINI, A. B.**; RIBEIRO, C. M.; PAVAN, F. R.; OLIVEIRA, A. B.; NETTO, A. V. G.; FARIAS, R. L.; MOREIRA, M. B. In vitro anti-MTB activity of Zinc (II) thiosemicarbazone complexes, and their interactions with DNA. 2022. (8th Latin American Symposium on Coordination and Organometallic Chemistry).
3. **LAZZARINI, A. B.**; FARIAS, R. L.; SILVA, D. E. S.; PEREIRA, J. C. M.; NETTO, A. V. G. Novo complexo de Pd(II) contendo ligante quelante k^2N,S -doador tiossemicarbazona e trifenilfosfina: ensaio antiproliferativo e estudos de interação de ligação com DNA/HSA. 2019. (XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP).
4. **LAZZARINI, A. B.**; CASTRO, P. R.; BIM, L. F. B.; CEBIM, M. A. Energy transfer in trivalent europium diphenylphosphinate matrix associated with a B-diketone ligand. 2018. (41ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)).

Traduções

1. **LAZZARINI, A. B.**; SILVA, S. F.; SOTÉRIO, C. Fontes, propriedades e aplicações do amido, 2022 (IYCN 2021).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. FRANCA, V. V.; **LAZZARINI, A. B.** Pint of Science Araraquara. 2019.
2. FARIA, F. A.; NASCIMENTO, E. R. F.; FRANCA, V. V.; TELES, R. S.; **LAZZARINI, A. B.** IV Mostra dos Trabalhos de Extensão da Unesp. 2017.
3. BARROSO, S.; **LAZZARINI, A. B.** Explorando e descobrindo a Matemática. 2017.

Dedico esse trabalho ao Frank, Chicão, Nina, Mel e Márcio (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades que me surgiram e eu tive o prazer de vivenciar; assim como a força, o ânimo e a coragem para sempre seguir em frente e ser resiliente frente a qualquer dificuldade encontrada.

À minha amada família, que me mostra, diariamente, o verdadeiro significado de amor e amizade. Em especial, ao Frank Lazzarini, que foi o nosso companheiro durante dez anos.

Ao meu querido namorado, por todo apoio, parceria e amor.

Ao Prof. Dr. Adelino V. G. Netto, pela confiança e apoio diários em todo o trabalho desenvolvido.

A todos os meus colegas de laboratório pela amizade e ajuda ao longo desses anos.

A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes.

Ao Instituto de Química pela infraestrutura oferecida, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (número processo 132024/2020-9).

Obrigada!

"Until you spread your wings, you'll have no idea how far you can fly."

Napoleão Bonaparte

RESUMO

O câncer, como o maior problema de saúde pública dentre as doenças não-infecciosas, resultou em 19,3 milhões de novos casos mundialmente, assim como onerou aos EUA US\$208,9 bilhões em 2020. Os metalofármacos utilizados como quimioterápicos no tratamento do câncer são limitados por resistência celular e efeitos colaterais. Uma vez que compostos à base de prata(I), assim como a coordenação de ligantes bioativos, e.g. tiossemicarbazonas e 1,10-fenantrolina, têm demonstrado destaque na Química Inorgânica Medicinal, neste trabalho, foi proposto a síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de um complexo inédito de fórmula molecular $[Ag(cTSC)(phen)]NO_3 \cdot H_2O$ (**C1**), sendo cTSC = *N*(4)-etil-cinamaldeído tiossemicarbazona (**cTSC**), e phen = 1,10-fenantrolina. A caracterização foi fundamentada nas técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear com núcleo de hidrogênio (RMN 1H), ultravioleta visível (UV-Vis) e espectrometria de massas (ESI-MS), assim como por meio da análise elementar e condutividade molar. O composto mostrou-se ativo frente às linhagens tumorais humanas A549 (pulmão), MCF-7 (mama) e A2780cis (ovário), enquanto o ligante **cTSC** não apresentou atividade antiproliferativa nas mesmas condições. Ademais, ao comparar com estudos da literatura, propõe-se que o fragmento tiossemicarbazona seja o grupo farmacofórico do composto inorgânico. Além disso, pela elevada atividade antiproliferativa em células resistentes à cisplatina, sugere-se que o mecanismo de ação de **C1** seja divergente ao reportado para o metalofármaco de platina(II). Por meio dos ensaios de titulação espectrofotométrica, **C1** apresentou 6% de hipocromismo na presença de *ct*-DNA em comprimento de onda fixo em 360 nm. O complexo metálico suprimiu 72% da fluorescência do Hoechst33258-DNA e 11% do TO-DNA. Por fim, por meio do dicróismo circular, percebeu-se que **C1** não altera de forma significativa ambas as bandas positiva e negativa do DNA quando a relação entre as concentrações do complexo para a biomacromolécula variam entre 0 e 0,2. Entretanto, em razões de 0,3 a 0,4, **C1** consegue potencializar a interação de empilhamento π do DNA, sem proporcionar a transição da forma B para as formas A ou Z. Em suma, propõe-se que a interação entre o complexo metálico inédito e o DNA seja de natureza fraca.

Palavras-chave: câncer; quimioterapia; compostos de prata; tiossemicarbazonas; DNA.

ABSTRACT

Cancer is the leading non-infectious health problem and resulted in 19.3 million new cases worldwide and US\$208.9 billion in USA during 2020. The commonly used metalopharmaceuticals in cancer therapy have some limitations, e.g. cell resistance and side effects. Silver(I)-based complexes as well as coordinating bioactive ligands, such as thiosemicarbazones and 1,10-phenanthroline, have demonstrated interest in Medicinal Inorganic Chemistry. In this work, it is described the synthesis, characterization, and antiproliferative activity evaluation of a novel metal complex with chemical formula $[Ag(cTSC)(phen)]NO_3 \cdot H_2O$ (**C1**), in which cTSC = *trans*-cinnamaldehyde-*N*(4)-ethyl-thiosemicarbazone (**cTSC**), and phen = 1,10-phenanthroline. The techniques used for characterization were infrared (IR), magnetic nuclear resonance (NMR 1H), visible ultraviolet (UV-Vis), mass spectrometry (ESI-MS), elemental analysis, and molar conductivity. **C1** showed great antiproliferative activity towards the human tumour cell lines A549 (lung), MCF-7 (breast), and A2780cis (ovarian; resistant to cisplatin), whilst **cTSC** was biologically inactive in same conditions. Moreover, it is proposed that the thiosemicarbazone moiety is the pharmacophore group of the metal complex. It is also suggested that **C1** overcomes the cisplatin resistance mode of action in A2780cis cell line. Spectroscopy studies reveal that **C1** exhibits 6% of hypochromism, and no significant red/blue shift in 360 nm in the presence of increasing amounts of ct-DNA. Competitive binding assays indicate that the silver(I) complex quenched 72% of Hoechst33258-DNA and 11% of TO-DNA. By means of circular dichroism, **C1** does not significantly change both positive and negative DNA signals when the relationship between the concentrations of the metal complex and biomacromolecule ranges from 0 to 0.2. In contrast, when the relationship is 0.3 - 0.4, **C1** increases π - π^* stacking base pair, with no alteration in B-DNA form to A-DNA or Z-DNA. In summary, it is proposed that **C1** interacts weakly with DNA.

Keywords: cancer; chemotherapy; silver-based compounds; thiosemicarbazones; DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de agentes carcinogênicos.	22
Figura 2 – Ônus estimado em 2015 e 2020 em função de cada tipo de câncer nos EUA.	24
Figura 3 - Exemplos de compostos à base de platina(II) aprovados para uso clínico.	26
Figura 4 – Mecanismo de ação geral da cisplatina e seus análogos de Pt(II).	27
Figura 5 - Comparação entre as constantes de estabilidade global para reações equivalentes de Ni(II) com ligante monodentado (Reação 1) e bidentado (2), na qual en = etilenodiamina.	29
Figura 6 – Reação hipotética de substituição de um ligante quelato (etilenodiamina) por ligantes monodentados (H ₂ O).	30
Figura 7 - Moléculas reportadas por Li et al. (2018) ³⁹	31
Figura 8 - Algumas geometrias moleculares de Ag(I).	32
Figura 9 – Complexo metálico [Ag(O ₂ CNEt ₂)] reportado por Bresciani et al. (2022) ⁴⁹	33
Figura 10 - Tautomerismo tiona-tiol de tiossemicarbazonas; R = H, alquil, aril.	36
Figura 11 – Modificações estruturais entre os compostos reportados por Silva et al. (2020) e o proposto neste trabalho ⁸¹	38
Figura 12 - Esquema geral da síntese do complexo metálico C1	41
Figura 13 - Mecanismo de reação proposto para a formação da tiossemicarbazona cinemaldeído cTSC	46
Figura 14 – Diagrama de desdobramento do campo cristalino para a Ag(I) com geometria tetraédrica.	48
Figura 15 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para (A) o ligante tiossemicarbazona cinemaldeído (B) o complexo à base de Ag ⁺	50
Figura 16 – Reação de dissociação proposta para C1 em DMSO.	53
Figura 17 – Espectro de IES(+)-EM de C1 em uma mistura de DMSO e MetOH. ...	53
Figura 18 – Espectro experimental de IES(+)-EM de C1 na região de 512 a 532 (m/z).	54
Figura 19 - Espectro teórico proposto pela plataforma Scientific Instrument Services (SIS) by Adaptas Solutions de IES(+)-EM de C1 na região de 512 a 532 (m/z).	54

Figura 20 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 para o ligante tiossemicarbazona cinamaldeído (cTSC).	55
Figura 21 - Espectro de RMN ^1H em $\text{DMSO } d_6$ para o complexo contendo Ag(I) , phen e tiossemicarbazona cinamaldeído (C1).	57
Figura 22 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o ligante tiossemicarbazona cinamaldeído com concentração $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO ...	60
Figura 23 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o complexo C1 em DMSO e a sua respectiva linearização segundo a Lei de Lambert-Beer.	61
Figura 24 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o complexo C1 nos tempos de 0h, 24h e 48h em (A) DMSO (B) 80% DMSO e 20% tampão tris-HCl. ...	62
Figura 25 – Reação de redução do MTT a formazan.	63
Figura 26 – Componentes da estrutura do DNA.....	66
Figura 27 - Modos de interação entre moléculas bioativas e DNA.	68
Figura 28 - Espectro de absorção da região do UV-Vis do complexo C1 com concentração de DNA variando entre 0-60 μM e a sua respectiva linearização segundo a Equação de Benesi.	70
Figura 29 – Fórmula estrutural Hoechst 33258.	71
Figura 30 - Espectro de emissão de fluorescência do Hoechst 33258-DNA com concentrações de C1 variando entre 0-60 μM	72
Figura 31 - Fórmula estrutural Laranja de Tiazol (TO).	73
Figura 32 - Espectro de emissão de fluorescência do TO-DNA com concentrações de C1 variando entre 0-60 μM	74
Figura 33 - Dicroísmo Circular do DNA com relação de $[\text{C1}]/[\text{DNA}]$ variando entre 0 a 0,4.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CHN% para o C1	48
Tabela 2 - Atribuição dos sinais de absorção na região do infravermelho para cTSC e C1	51
Tabela 3 – Condutividade para o complexo C1 em DMSO.	52
Tabela 4 - Atribuição dos sinais de ¹ H para o ligante cTSC	56
Tabela 5 - Atribuição dos sinais de ¹ H para o complexo C1	58
Tabela 6 – Atividade antiproliferativa do ligante cTSC e do complexo metálico C1 frente às	64
Tabela 7 – Comparação dos valores de IC ₅₀ para C1 e o composto reportado por Silva et al. ⁸¹ (3) ([Ag(phen)(L)]NO ₃ , L = 2-formilpiridina-N(4)-etil-tiossemicarbazona).	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A2780: linhagem celular de câncer de ovário
A2780cis: linhagem celular de câncer de ovário resistente à cisplatina
A549: linhagem celular de câncer de pulmão
ACN: acetonitrila
Ag(I): prata(I)
AgCl: cloreto de prata
AgNO₃: nitrato de prata
b: caminho óptico
B₀: campo magnético estático
B₁: campo magnético induzido
BRL-3A: linhagem celular sadia de fibroblasto de fígado
C1: [Ag(cTSC)(phen)]NO₃.H₂O
CD: dicroísmo circular
CDCl₃: clorofórmio deuterado
CO₂: dióxido de carbono
ct-DNA: Ácido desoxirribonucleico do timo de bezerro (*calf thymus*)
cTSC: N(4)-etil-cinamaldeído tiossemicarbazona
d: densidade
DMSO: dimetilsulfóxido
DMSO d⁶: dimetilsulfóxido deuterado
DNA-A: forma A do ácido desoxirribonucleico
DNA-B: forma B do ácido desoxirribonucleico
DNA-Z: forma Z do ácido desoxirribonucleico
DU-145: linhagem celular de câncer de próstata
ESI-MS: espectrometria de massas com ionização por electrospray
EROs: espécies reativas de oxigênio
H₂O: água
H33258: Hoechst 33258
Hep-G2: linhagem celular de câncer de fígado
Hepa1-6: linhagem celular de câncer de fígado murino
HeLa: linhagem celular de câncer cervical
HOMO: orbital molecular ocupado de maior energia

HSAB: teoria ácido-base de Pearson

HT-29: linhagem celular de câncer colorretal

IC₅₀: concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

IS: índice de seletividade

IV: infravermelho

KBr: brometo de potássio

LUMO: orbital molecular desocupado de menor energia

m/z: relação massa-carga

MCF-7: linhagem celular de câncer de mama

MDA-MB-231: linhagem celular de câncer de mama triplo negativo

MRC-5: linhagem celular sadia de fibroblasto de pulmão

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio

N₂: nitrogênio molecular

NaCl: cloreto de sódio

NC: número de coordenação

NH₃: amônia; ligante amin

NHDF: linhagem celular sadia de fibroblastos dérmicos

NO₃⁻: nitrato

phen: 1,10-fenantrolina

Pd(II): paládio(II)

PNT-2: linhagem celular sadia de próstata

PPh₃: trifenilfosfina

Pt(II): platina(II)

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de núcleo de hidrogênio

RNA: ácido ribonucleico

RR: ribonucleotídeo redutase

TO: Laranja de Tiazol

Top: topoisomerase

TrxR: tiorredoxina redutase

TSC: tiossemicarbazona

UV-Vis: ultravioleta-visível

ΔE: diferença de energia

ε: coeficiente de absorvidade molar

λ: comprimento de onda

δ (IV): deformação angular no plano

δ (RMN): deslocamento

ν : estiramento

τ : título

Λ_m : condutividade molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Câncer.....	22
1.2	Quimioterápicos à base de platina(II).....	25
1.3	Oportunidades no desenvolvimento de novos metalofármacos.....	28
1.4	Modulação da atividade biológica de complexos metálicos por meio de ligantes bioativos: Tiossemicarbazonas.....	35
1.5	Hipótese.....	37
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos Específicos.....	39
3	METODOLOGIA	40
3.1	Instrumentação	40
3.2	Síntese	40
3.3	Caracterização	42
3.4	Estudos de estabilidade em solução	42
3.5	Ensaio biológico	42
3.5.1	Avaliação da atividade antiproliferativa.....	42
3.5.2	Ensaio de Interação com DNA.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Química.....	45
4.2	Caracterização.....	48
4.2.1	Análise Elementar	48
4.2.2	Infravermelho	49
4.2.3	Condutividade	52

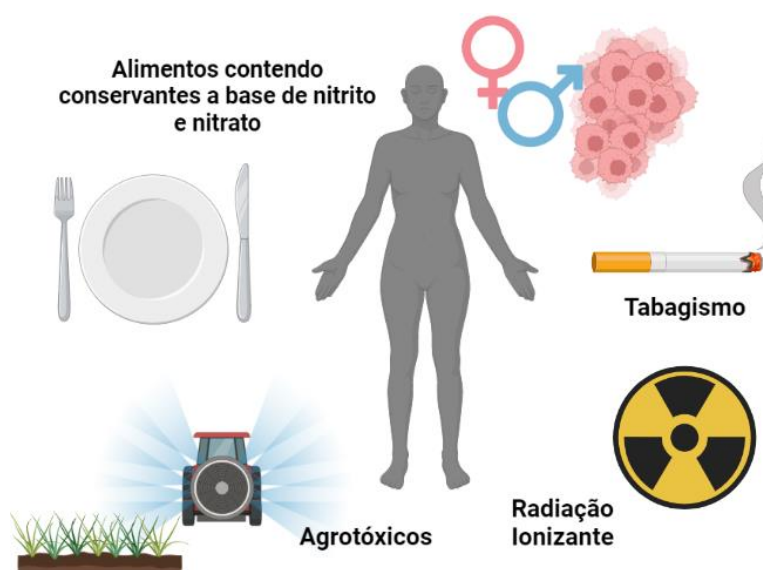
4.2.4 Espectrometria de Massas	53
4.2.5 RMN ¹H	54
4.2.6 UV-Vis	59
4.2.7 Estudos de Estabilidade em Solução	62
4.3 Ensaios Biológicos	63
4.3.1 Avaliação da atividade antiproliferativa	63
4.3.2 Ensaios de Interação com DNA	65
4 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A mutação de um gene, especialmente os que apresentam a função de crescimento e replicação celular, pode acarretar na reprodução desordenada de células e, conseqüentemente, em uma série de doenças, as quais são denominadas câncer¹⁻⁵. A disposição de um indivíduo apresentar um quadro clínico de câncer é diretamente proporcional aos hábitos e alimentos introduzidos na rotina do mesmo, uma vez que aumentam a frequência de exposição a agentes carcinogênicos e a probabilidade dos mesmos resultarem em uma mutação genética^{3; 6; 7}. Destacam-se como fatores que potencializam a formação de tumores o tabagismo, a exposição ao amianto e à radiação ionizante, o consumo de alimentos contendo conservantes à base de nitrito e nitrato, assim como agrotóxicos (Figura 1)^{2; 6}.

Figura 1 – Exemplos de agentes carcinogênicos.



Fonte: Autor; criado com BioRender.com.

O processo de carcinogênese, isto é, o desenvolvimento de um tumor, engloba as etapas de iniciação, promoção e progressão. O agente carcinogênico entra em contato com células sadias e promove uma mutação (iniciação). O contato frequente de células iniciadas com agentes oncopromotores pode promover tais células a malignas (promoção). Por fim, as células malignas multiplicam-se em alta velocidade,

resultando no câncer (progressão) ⁸. Quando células tumorais se espalham para partes do organismo as quais se diferenciam da sua origem, tem-se a metástase ⁵.

O câncer é o maior problema de saúde pública dentre as doenças não-infecciosas ^{9; 10}. A Ásia é o continente com maior número de óbitos devido ao câncer (58,3%), seguido pela Europa (19,6%) ^{11; 12}. Dentre os tipos de câncer que são mais incidentes na população global, destacam-se o câncer de mama e de pulmão com mais de 2 milhões de novos casos em 2020, correspondendo, respectivamente, a 11,7% e 11,4% de todos os 19,3 milhões de novos casos reportados no ano ^{11; 12}. Ademais, foram reportados, durante o mesmo período, 2,5% de novos casos de câncer de ovário e 30,3% de câncer de mama na população feminina brasileira ¹¹.

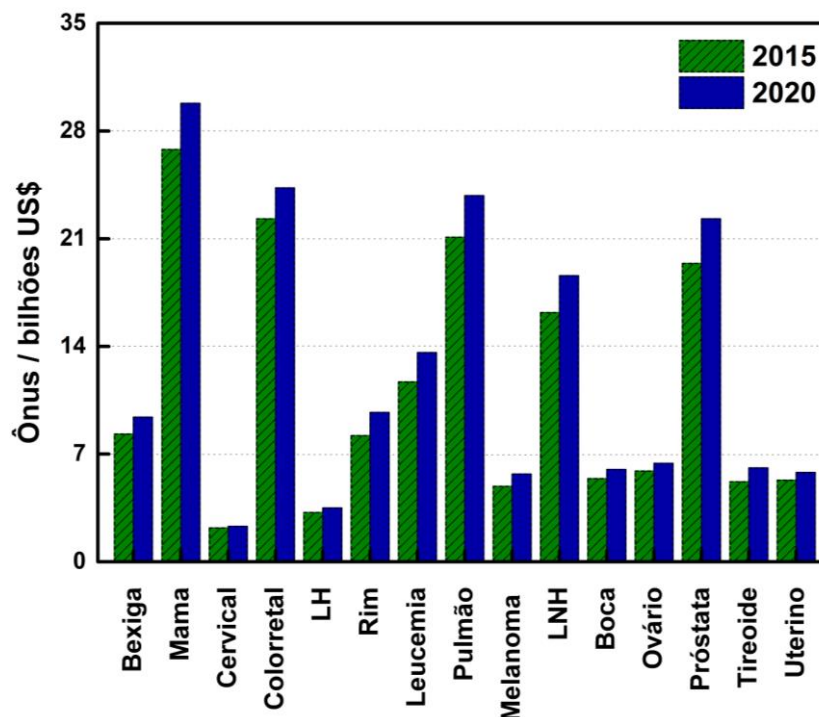
De acordo com Sung *et al.*¹², em 2040, a incidência de câncer a âmbito global terá um aumento de 47% dos novos casos reportados em 2020, assim como segundo a World Health Organization (WHO), no Brasil, haverá 133.118 casos de câncer de mama e 68.429 de câncer de pulmão, representando, nessa ordem, um aumento de 55% e 98% dos casos de 2018 ¹³. Por sua vez, conforme estimativas da American Cancer Society e Siegel *et al.*⁹, aproximadamente 1.700 habitantes dos Estados Unidos da América (EUA) irão a óbito diariamente em 2022 devido ao câncer ⁴.

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) tem, como hipótese, que o aumento da incidência de câncer ao longo dos anos deve-se ao incremento da densidade demográfica e da longevidade da população, assim como a diferente relação e distribuição entre os indivíduos e agentes carcinogênicos ^{10; 13}. De forma geral, o organismo elimina as células que foram danificadas durante a etapa de iniciação, contudo, essa habilidade natural sofre decréscimo devido à senescência, ou seja, a eliminação dessas células que podem originar tumores, em indivíduos idosos, tende a ocorrer de forma menos efetiva em relação à população mais jovem ^{2; 5}. Ressalta-se também que essa parcela de indivíduos apresenta um maior acúmulo de exposição a agentes carcinogênicos, justificando assim a alta incidência de câncer na população idosa ².

Ademais ao câncer ser um problema de saúde pública, ele também corresponde a um problema econômico, onerando aos EUA, aproximadamente, US\$208,9 bilhões em 2020, o que equivale a um aumento de 10% do ônus de 2015 (US\$190,2 bilhões) ¹⁴. Na Figura 2, encontram-se os custos estimados com cada tipo de câncer nos EUA

em 2015 e 2020. Percebe-se que o maior custo associado ao câncer se deve ao câncer de mama, com valor equivalente a US\$29,8 bilhões em 2020.

Figura 2 – Ônus estimado em 2015 e 2020 em função de cada tipo de câncer nos EUA.



Fonte: Autor; dados disponibilizados por National Cancer Institute ¹⁴.

Uma vez que o quadro clínico de câncer, assim como o próprio tratamento da doença, estão associados a alterações no sistema imunológico, indivíduos nessas condições apresentam uma maior probabilidade de adquirir formas mais severas de outras doenças, como por exemplo infecções ¹⁵. A doença infecciosa COVID-19, cuja origem deve-se ao vírus SARS-CoV-2, reflete diretamente nos pacientes que têm câncer, posto que estes pertencem ao grupo de risco da doença ^{16; 17}. Da mesma forma, outra influência direta da pandemia mundial do coronavírus iniciada em 2020 foi o atraso no tratamento de pacientes com câncer, seja em função da restrição de acesso a alguns ambientes ou do medo enfrentado pelo indivíduo em contrair a infecção ⁹. Como consequência, estima-se que haja um aumento na incidência de casos em estágio mais avançado e de óbitos devido ao câncer ⁹.

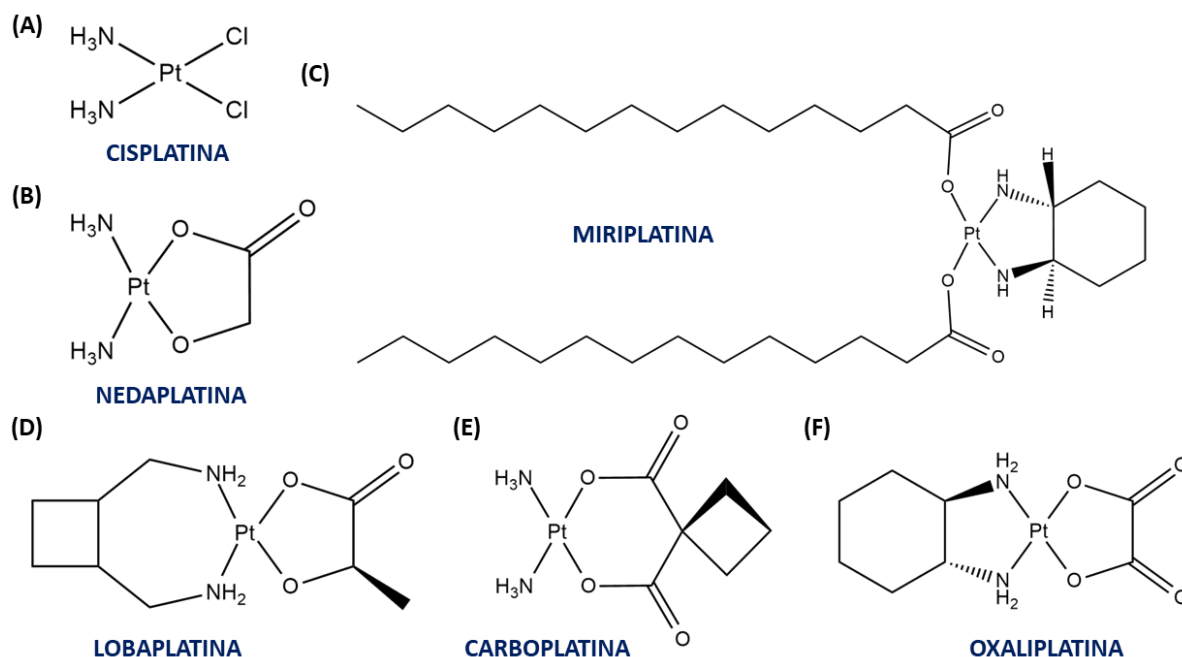
O tratamento de pacientes que apresentam quadro clínico de câncer é fundamentado em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia ^{2; 18}. Em 50% dos tratamentos de quimioterapia, utilizam-se fármacos à base de platina(II) como quimioterápicos ^{19; 20}. Tal família engloba a cisplatina e seus análogos, denominados compostos de 2^a e 3^a geração, e.g. carboplatina e oxaliplatina ^{19; 21; 22}.

1.2 Quimioterápicos à base de platina(II)

A *cis*-diaminobiscloridoplatina(II), isto é, a cisplatina (Figura 3A) foi primeiramente sintetizada em 1845, porém só teve suas propriedades biológicas determinadas em 1965 por Barnett Rosenberg na Universidade Estadual de Michigan, localizada nos EUA ^{19; 20; 23; 24}. Em suma, foi determinado que a divisão celular de uma cultura de *Escherichia coli* era diretamente afetada em função de um sistema submetido a uma corrente elétrica contendo eletrodos de platina e uma solução de íons cloreto e amônio, ^{20; 24; 25}. Após dois anos, foi proposto que a atividade antibacteriana se deve à formação do composto de fórmula molecular *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] ²⁴. Como consequência à descoberta, os efeitos antitumorais da cisplatina foram estudados e, posteriormente reportados ²⁴. Aprovou-se o uso do complexo metálico para fins clínicos em 1978 nos EUA e em 1979 na União Europeia ^{26; 27}.

Motivados pelos resultados antitumorais obtidos com a cisplatina, diversos complexos metálicos à base de platina(II) foram desenvolvidos e aprovados como antineoplásicos ao redor do mundo. Tais moléculas são conhecidas como compostos de 2^a e 3^a geração. Destacam-se a nedaplatina e a miriplatina no Japão, a lobaplatina na China, e a carboplatina e a oxaliplatina a âmbito global (Figura 3B-F) ^{19; 22; 23; 26}. Todas essas espécies compartilham de mesma geometria quadrático-planar, com os ligantes orientados em forma *cis* ²¹.

Figura 3 - Exemplos de compostos à base de platina(II) aprovados para uso clínico.



Fonte: Autor.

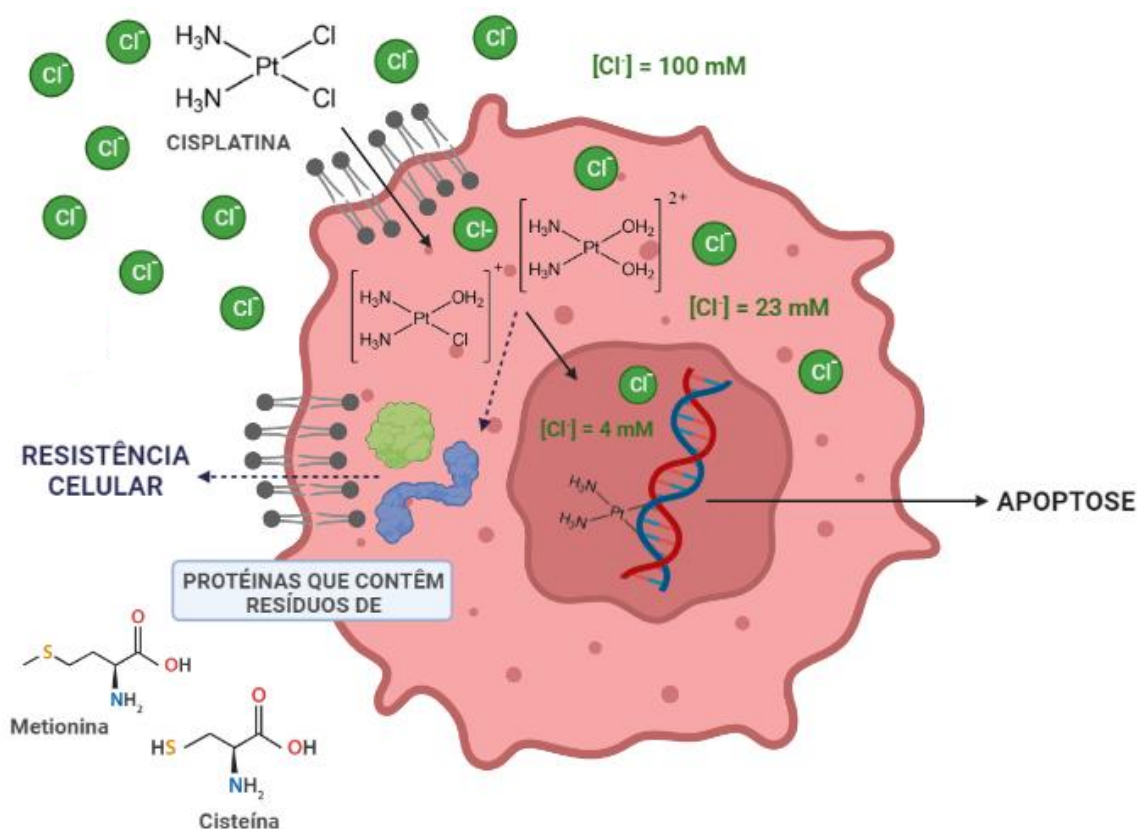
A cisplatina e seus análogos de 2^a e 3^a geração compartilham de similares mecanismos de ação no organismo (Figura 4) ¹⁹. A cisplatina se mantém íntegra em ambientes que contém altas concentrações de cloreto, assim como no meio extracelular ($[Cl^-]_{extracelular} \approx 100 \text{ mM}$), portanto, nessas condições, sua carga líquida é zero (molécula neutra) ^{20; 28}. Dessa forma, quando a espécie de Pt(II) não é desativada ao interagir fortemente com proteínas presentes no plasma sanguíneo, e.g. albumina do soro humano (HSA), a mesma apresenta a capacidade de adentrar a membrana celular ^{20; 22}. Por sua vez, o meio intracelular apresenta baixa concentração de íons cloreto ($[Cl^-]_{citoplasma} \approx 23 \text{ mM}$; $[Cl^-]_{núcleo} \approx 4 \text{ mM}$), favorecendo a reação de aquação da cisplatina, seja pela substituição dos grupos lábeis Cl^- por uma ou duas moléculas de água ^{20; 22; 23; 27}. Para os complexos análogos à cisplatina, o grupo carboxilato apresenta maior labilidade em relação ao grupo amin ²².

Como consequência à mono ou dissustituição dos ligantes cloreto pela água, os complexos metálicos catiônicos resultantes, $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ e $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$, apresentam atração por moléculas altamente nucleofílicas, como pode ser exemplificado por peptídeos e proteínas que contém resíduos de aminoácidos à base

de enxofre (e.g. cisteína e metionina) ^{21; 22}. A interação com tais espécies caracterizam alguns dos mecanismos de resistência celular.

O principal alvo biológico da cisplatina e seus análogos é o poliânion DNA ^{20; 21; 22}. Entretanto, estima-se que apenas 1% da cisplatina que adentrou o meio intracelular consiga de fato interagir com a dupla hélice ^{20; 27}. Dentre os diversos possíveis modos de interação entre os complexos e o DNA, destaca-se que, em 60-65% dos casos, ocorre a descoordenação dos grupos aqua e a subsequente formação da ligação cruzada 1,2-intrafitita via nitrogênio (N7) da guanina ^{20; 21; 29; 30}. Tal átomo apresenta superior nucleofilicidade e, conseqüentemente, reatividade em comparação aos respectivos átomos de nitrogênio das demais bases nitrogenadas, favorecendo dessa forma, o ataque nucleofílico ao centro metálico de Pt(II) ²⁰. Como consequência à reação, há uma alteração na conformação do DNA, acarretando a inviabilidade de replicação celular e, por fim, levando a célula à apoptose ^{19; 22; 30; 31}.

Figura 4 – Mecanismo de ação geral da cisplatina e seus análogos de Pt(II).



Fonte: Autor; criado com BioRender.com.

Entretanto, em oposição aos benefícios atrelados à atividade antitumoral apresentada pelos complexos de Pt(II) aprovados para uso clínico, os mesmos também interagem com as células saudáveis^{22; 32}. Uma vez que apresentam baixo índice de seletividade (IS), pacientes que são tratados com tais quimioterápicos, em geral, manifestam alguns efeitos colaterais, como por exemplo náusea, vômito, nefrotoxicidade (toxicidade renal), neurotoxicidade (toxicidade neurológica), hepatotoxicidade (toxicidade nos rins), mielossupressão (toxicidade na medula óssea) e ototoxicidade (toxicidade auditiva)^{20; 22; 30-34}. Ressalta-se que o aumento da labilidade do grupo de saída, tal como clorido e carboxilato, é diretamente proporcional à respectiva reatividade do composto no organismo e a consequente toxicidade²². Ademais, a resistência celular, seja intrínseca ou adquirida, faz com que haja uma limitação na eficiência dos fármacos como agentes antitumorais^{21; 22; 31}.

Motivados pela necessidade do desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos, em 2017, aprovou-se na União Europeia o uso comercial da padeliporfina (Tookad®), cuja estrutura contém o centro metálico de paládio(II)³⁵. Contudo, o fotossensibilizador é restrito ao câncer de próstata de baixo risco³⁵. Problemas relacionados à urina (e.g. incontinência urinária e dor), assim como disfunção erétil, aumento do número de enzimas hepáticas no fígado, e alterações na frequência cardíaca são exemplos de efeitos colaterais atrelados ao tratamento com o complexo metálico e que afetam 25% dos pacientes³⁵. Salienta-se que a Agência Europeia de Medicamentos reportou que tais efeitos colaterais foram observados principalmente quando se utilizou de fibras ópticas durante a terapia fotodinâmica³⁵.

Portanto, face ao exposto, percebe-se a urgência no desenvolvimento de novos compostos que apresentem atividade antitumoral e que possam ser utilizados como agentes antineoplásicos, sobretudo em células que apresentem resistência celular aos fármacos comercializados.

1.3 Oportunidades no desenvolvimento de novos metalofármacos

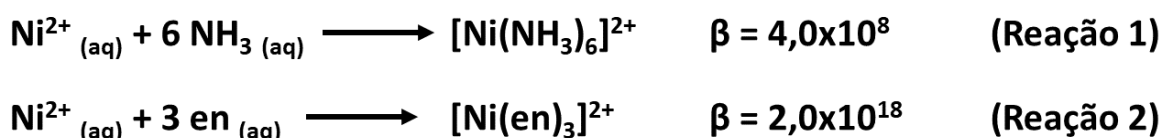
Percebe-se um crescente destaque na Química Inorgânica Medicinal almejando novos compostos bioativos. Estima-se que, anualmente, haja um investimento superior a US\$1 bilhão/ano pela Indústria Farmacêutica para tal fim, especialmente

tendo em vista compostos com maior eficácia e índice de seletividade, isto é, resultando em menos efeitos colaterais ²⁹.

Percebe-se a importância na utilização de átomos doadores de densidade eletrônica que formem ligações termodinamicamente fortes com o centro metálico. Da mesma forma, a utilização de uma espécie que pode se coordenar em quelato pode ser de grande valia a fim de modular a cinética de troca de ligantes de um centro metálico lábil. Nesse caso, tem-se os efeitos quelato cinético e termodinâmico.

O efeito quelato termodinâmico deve-se ao aumento entrópico do sistema e a consequente maior estabilidade termodinâmica do produto formado quando um agente quelante complexa ao centro metálico em comparação a um ligante monodentado ^{36; 37}. A fim de melhor esclarecimento, observa-se as reações ilustradas na Figura 5, na qual a constante de estabilidade global da reação contendo o ligante quelante etilenodiamina é 10^{10} vezes superior em comparação ao complexo equivalente contendo um ligante monodentado (NH_3) ³⁶. Logo quanto maior for a constante de equilíbrio de uma reação, pois mais termodinamicamente estável é o produto resultante em relação aos reagentes ³⁶.

Figura 5 - Comparação entre as constantes de estabilidade global para reações equivalentes de Ni(II) com ligante monodentado (Reação 1) e bidentado (2), na qual en = etilenodiamina.

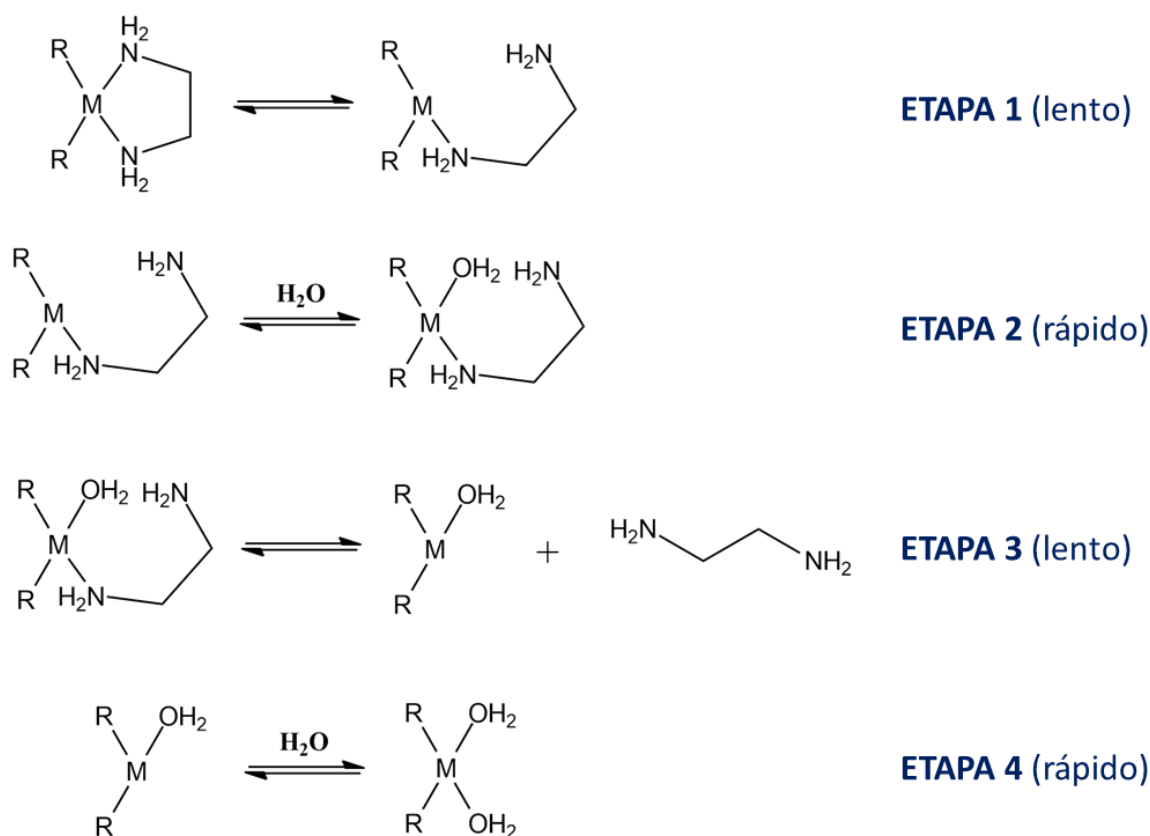


Fonte: Adaptado de Rodgers (2018) ³⁶.

Por sua vez, para compreender de maneira mais clara o efeito quelato cinético, compara-se a cinética de substituição de um ligante quelato coordenado com a de um ligante monodentado nas mesmas condições. Para um ligante quelato, a reação ocorre mais lentamente devido à energia necessária para retirar o primeiro átomo coordenado e à possibilidade de reversão da etapa 1 (Figura 6) com a religação do mesmo ao centro metálico, uma vez que o metal e o primeiro átomo descoordenado estão próximos um ao outro, acarretando na diminuição da barreira energética

necessária para que haja novamente a formação da ligação coordenada entre ambos em comparação se fosse um ligante monodentado ³⁸. Com isso, é necessário que, no exemplo ilustrado na Figura 6, após descoordenação do átomo de nitrogênio da etilenodiamina na etapa 1, o ligante consiga rotacionar visando afastar o grupo -NH₂ livre do metal, visando diminuir a probabilidade de recoordenação. Também vale ressaltar a baixa cinética da etapa 3, visto que o intermediário se encontra em baixa concentração e a alta probabilidade já mencionada da primeira etapa de ocorrer no sentido inverso. Em função do arcabouço molecular de cada sistema, o efeito quelato cinético apresenta potencial de diminuir a velocidade de substituição do ligante quelato por uma molécula de água (reação de aquação) por fatores de 20 a 10⁵.

Figura 6 – Reação hipotética de substituição de um ligante quelato (etilenodiamina) por ligantes monodentados (H₂O).

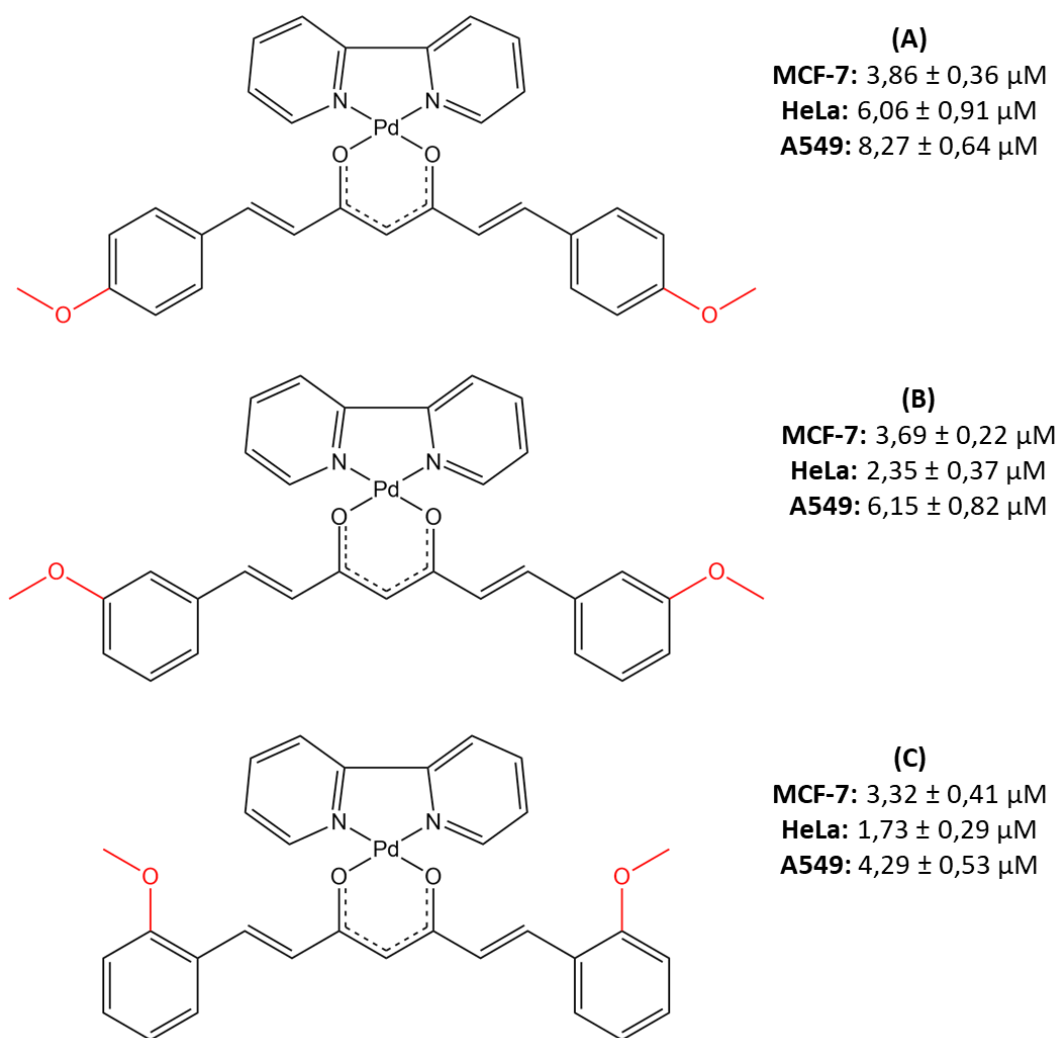


Fonte: Adaptado de Miessler; Fischer; Tarr (2014) ³⁸.

Li *et al.*³⁹ reportou três compostos inéditos contendo Pd(II) e análogos da curcumina como ligantes (Figura 7). Os complexos de fórmula geral [Pd(bipy)(BDHC-

A)]PF₆, na qual bipy = 2,2'-bipiridina e BDHC-A = derivados da curcumina, apresentaram maior atividade antiproliferativa frente às linhagens tumorais humanas MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer cervical) e A549 (câncer de pulmão) com valores de IC₅₀ entre 3,32-3,86 μM, 1,73-6,06 μM e 4,29-8,27 μM, respectivamente, em relação à cisplatina (IC₅₀ MCF-7 = 19,65 μM; IC₅₀ HeLa = 16,72 μM; IC₅₀ MCF-7 = 20,10 μM)³⁹. O mecanismo de ação sugerido para a espécie de maior citotoxicidade envolve a morte celular via apoptose devido a espécies reativas de oxigênio (EROs)³⁹.

Figura 7 - Moléculas reportadas por Li *et al.* (2018)³⁹.



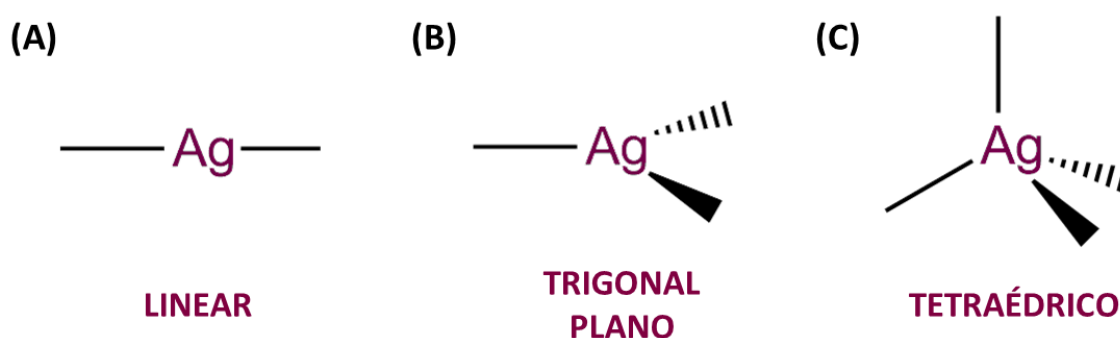
Fonte: Autor.

Em um segundo estudo descrito por Hormann e colaboradores⁴⁰, dois complexos contendo o centro metálico de cobre(II) mostraram-se altamente seletivos para o

tecido de pulmão utilizando a linhagem celular humana tumoral A549 ($IC_{50} = 1,3-1,4 \mu M$) e não-tumoral NHDF (fibroblastos dérmicos; $IC_{50} = 8,1-13,4 \mu M$). Os índices de seletividade equivalem a, aproximadamente, 6 e 10⁴⁰. É conhecido que valores de IS superiores a 3 já compreendem espécies antitumorais altamente seletivas^{41; 42; 43; 44}. Os promissores valores de seletividade são justificados pela bisintercalação seletiva no DNA em função de sequências de pares de bases específicas⁴⁰.

Destaca-se o uso da prata(I) para fins medicinais. Além da atividade antitumoral, a prata também pode ter a sua toxicidade aplicada frente a microrganismos, tais como bactérias, fungos e protozoários^{45; 46}. Mesmo a prata podendo apresentar estados de oxidação +2 e +3, os mesmos são pouco estáveis, logo complexos à base de prata tendem a conter o centro metálico de prata(I), cuja configuração eletrônica de valência é d^{10} ^{47; 48}. Como consequência a não estabilização do campo cristalino, tais compostos tendem a não apresentar preferência por determinadas geometrias moleculares⁴⁷. Alguns exemplos de geometria são, respectivamente, para os números de coordenação (NC) 2, 3 e 4, linear, trigonal plano e tetraédrico (Figura 8)⁴⁷.

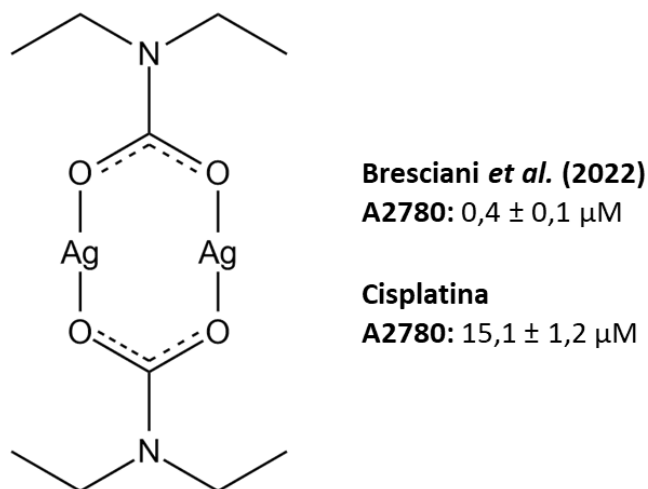
Figura 8 - Algumas geometrias moleculares de Ag(I).



Fonte: Autor.

Bresciani *et al.*⁴⁹ reportou o complexo metálico de fórmula molecular $[Ag(O_2CNEt_2)]$ (Figura 9) que apresentou IC_{50} equivalente a $0,4 \pm 0,1 \mu M$ frente à linhagem tumoral de ovário A2780. A referência foi realizada utilizando-se de cisplatina ($IC_{50} = 15,1 \pm 1,2 \mu M$)⁴⁹. O efeito citotóxico reportado corresponde à estimulação de estresse oxidativo pelo composto na célula⁴⁹.

Figura 9 – Complexo metálico $[Ag(O_2CNEt_2)]$ reportado por Bresciani *et al.* (2022) ⁴⁹.



Fonte: Autor.

O mecanismo de ação geral da $Ag(I)$ para células tumorais ainda não foi totalmente elucidado, porém é reportado que pode ser fundamentado na inibição da replicação celular e consequente apoptose via interação com ácidos nucleicos presentes no DNA e RNA; na morte celular devido a espécies reativas de oxigênio (EROs); e na desnaturação de proteínas e enzimas em função de fortes interações formadas entre o centro metálico e grupos altamente nucleofílicos, tais como fosfato, hidroxila, carboxilato, amina e tiol ^{45; 50; 51}.

A principal desvantagem associada à utilização da prata(I) para fins medicinais deve-se a sua fácil dissociação em meio biológico e a sua consequente precipitação na forma de sal, e.g. $AgCl$ ^{52; 53}. Em contrapartida, como principais vantagens, as células apresentam baixa resistência celular frente aos compostos de $Ag(I)$, assim como baixa toxicidade em células saudas ^{50; 52}. Ademais, em oposição à atividade bacteriana, a qual pode envolver a ruptura da membrana celular, tal efeito não ocorre em células de mamíferos ⁵².

A baixa citotoxicidade em células saudas está diretamente atrelada a cinética lenta de liberação do cátion $Ag(I)$ a partir de complexos metálicos ^{53; 54}. Para que tal liberação seja lenta, uma estratégia engloba a utilização de ligantes polidentados que estabeleçam ligações fortes entre o centro metálico e o ligante. Segundo a teoria ácido-base de Pearson (HSAB), para ácidos macios, tais como $Ag(I)$, ligações mais

estáveis ocorrem, preferencialmente, na presença de bases macias, tais como fósforo, nitrogênio e enxofre ⁵⁵. Dentre os três átomos, espera-se que o nitrogênio seja a base mais dura. Entretanto, quando apresenta hibridização sp^2 , assim como o nitrogênio imínico de uma base de Schiff, o orbital hibridizado tem maior polarizabilidade em comparação ao orbital hibridizado sp^3 , devido a maior contribuição percentual do orbital s. Como consequência, o nitrogênio se torna uma base de caráter intermediário e, dessa forma, consegue formar ligações fortes e termodinamicamente mais estáveis com centros metálicos como Ag(I).

Em 2022, Varna *et al.*⁵⁶ reportou o complexo $[Ag(dmp2SH)(PPh_3)_2]NO_3$ contendo um ligante quelante (4,6-dimetilpirimidina-2-tiol = dmp2SH) coordenado via átomos de enxofre e nitrogênio. A espécie apresentou elevada citotoxicidade frente às linhagens tumorais HeLa ($IC_{50} = 0,75 \pm 0,01 \mu M$) e MCF-7 ($IC_{50} = 1,27 \pm 0,03 \mu M$) ⁵⁶. Por sua vez, Almeida *et al.*⁵⁷, descreveu dois ligantes *N,O*-doadores biologicamente inativos ($IC_{50} > 50 \mu M$) e quatro novas espécies de Ag(I) que, em geral, demonstraram serem mais ativas que a cisplatina para as linhagens MDA-MB-231 (câncer de mama triplo negativo), MCF-7, DU-145 (câncer de próstata), e PNT-2 (não-tumoral de próstata) com valores de IC_{50} equivalentes a, nessa ordem, 1,68 - 8,40 μM , 2,46 - 3,63 μM , 2,73 - 16,0 μM , e 2,55 - >50 μM , enquanto que IC_{50} cisplatina = 67,00 \pm 1,06 μM (MDA-MB-231); 19,90 \pm 4,20 μM (MCF-7); 15,0 \pm 1,40 μM (DU-145); 11,74 \pm 1,20 μM (PNT-2). Já Thati e colaboradores⁵⁸ estudaram a capacidade antitumoral do complexo $[Ag(hnc)(phen)_2]$ (hnc = 4-hidroxi-3-nitro-cumarina; phen = 1,10-fenantrolina), tendo como resultado o aumento da atividade antiproliferativa ($IC_{50} = 3,8 \pm 1,4 \mu M$) em relação ao ligante livre hncH ($IC_{50} = 220 \pm 2,8 \mu M$). A cisplatina apresentou valor de IC_{50} equivalente a 15,0 \pm 2,65 μM ⁵⁸. A linhagem celular humana utilizada foi referente ao câncer de fígado (Hep-G2) ⁵⁸.

A 1,10-fenantrolina (phen) e seus análogos são moléculas orgânicas heterocíclicas que têm mostrado promissora atividade biológica, em especial, quando coordenadas a um centro metálico e aplicadas para fins medicinais ^{58; 59}. Sua estrutura planar e a consequente facilidade em intercalar por entre os pares de bases nitrogenadas do DNA, assim como a capacidade em atuar como um ligante quelante na presença de centros metálicos compreendem algumas das propriedades atreladas a tal grupo e que favorecem a sua utilização em sistemas biológicos ^{60; 61}. Ademais, além da intercalação, outro possível modo de interação entre complexos metálicos

contendo o grupo phen e a biomacromolécula é por meio de interações hidrofóbicas com o sulco menor ⁶².

Como exemplo, Thornton e colaboradores⁶³ descreveu um composto inorgânico de fórmula $[Ag_2(phen)_3(udda)] \cdot 3H_2O$, sendo udda = ácido undecanóico. O composto foi ativo frente à linhagem tumoral humana MCF-7, com IC_{50} equivalente a $6,7 \pm 0,40 \mu M$ após 24h e $0,88 \pm 0,16 \mu M$ após 96h. Por sua vez, para a cisplatina e o ligante livre phen em 24h, tem-se respectivamente $IC_{50} = 19,6 \pm 1,44 \mu M$ e $IC_{50} = 43,6 \pm 4,05 \mu M$ ⁶³. Propôs-se que a interação da espécie inédita e o DNA ocorra via intercalação, sem danos à fita de dupla hélice da biomacromolécula ou a formação de EROs ⁶³.

Portanto, percebe-se que a inserção de um ligante quelante bioativo no arcabouço molecular de um complexo metálico é uma estratégia favorável ao desenvolvimento de um novo metalofármaco.

1.4 Modulação da atividade biológica de complexos metálicos por meio de ligantes bioativos: Tiossemicarbazonas

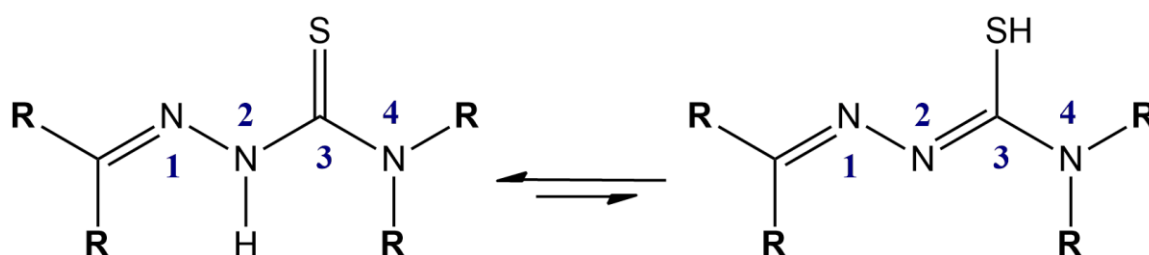
A complexação de ligantes bioativos tem-se mostrado uma estratégia promissora, uma vez que diversas propriedades do composto inorgânico formado podem ser divergentes às propriedades do ligante livre, tais como lipofilicidade, a qual resulta na diferenciação de concentração da espécie ativa que adentra o meio intracelular; possibilidade de diferentes interações com o alvo biológico em relação ao ligante livre devido à diferentes geometrias possíveis para a molécula; e a possibilidade de interação com diferentes alvos biológicos ^{64; 65}. Outra vantagem advinda da complexação é a facilidade em alterar aspectos cinéticos e termodinâmicos de uma determinada espécie por meio da escolha do centro metálico e dos ligantes ^{65; 66}. Ademais, o metal pode desempenhar diferentes funções no meio biológico, seja funcional, como ponto de conexão com o alvo biológico; estrutural, proporcionando uma conformação específica para ligar-se a biomoléculas por meio de interações não-covalentes; e transportador, no qual o metal atua apenas como carreador de ligantes ativos ⁶⁷.

As tiossemicarbazonas (TSCs) são bases de Schiff *N,S*-doadoras que apresentam atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antichagásica e antitumoral ⁶⁸⁻⁷⁴. Suas principais vantagens se devem à diversidade estrutural, pois que diferentes

grupos funcionais podem se ligar ao carbono imínico, acarretando diferentes possíveis atividades biológicas. Ademais, a facilidade e baixo custo de rota sintética são essenciais, uma vez que para que sejam sintetizadas, é necessário apenas a condensação de tiossemicarbazidas na presença de aldeídos ou cetonas ^{71; 72; 75}.

Uma característica inerente às tiossemicarbazonas é a elevada acidez do hidrogênio do fragmento hidrazínico, a qual se deve aos átomos de enxofre e nitrogênio, com ênfase no nitrogênio N2, que são retiradores de densidade eletrônica, enfraquecendo assim, a ligação N2-H_{hidrazínico}, facilitando por sua vez a desprotonação do hidrogênio em específico. Como consequência, tais moléculas apresentam tautomerismo tiona-tiol (Figura 10) em função da protonação ou desprotonação do hidrogênio hidrazínico ^{71; 75; 76}.

Figura 10 - Tautomerismo tiona-tiol de tiossemicarbazonas; R = H, alquil, aril.



Fonte: Autor.

O mecanismo de ação das tiossemicarbazonas são comumente relacionados à inibição de enzimas relacionadas à síntese e à replicação do DNA, tais como ribonucleotídeo redutase (RR) e topoisomerases (Top) ^{77; 78}. As ações de tiossemicarbazonas no organismo podem ser moduladas por meio da complexação. Diversos estudos da literatura reportam o aumento da atividade biológica da molécula orgânica frente a diversos centros metálicos, assim como o sobrepujamento de resistência celular ^{73; 77-79}. As tiossemicarbazonas podem se coordenar via diversos modos e diversos átomos, logo são caracterizadas como ligantes monodentados, bidentados ou polidentados, em função do grupo adicional anexado ao carbono imínico ^{71; 73}.

Abdul Halim e colaboradores⁸⁰ desenvolveram cinco complexos metálicos inéditos de Ag(I) com tiossemicarbazona, demonstrando promissora citotoxicidade frente às células tumorais MDA-MB-231, HT-29 (colorretal) e MCF-7. Respectivamente, os valores de IC₅₀ variaram entre 2,55 - 4,66 µM, 2,20 – 3,11 µM, e 3,20 – 4,53 µM. Em um segundo estudo, Khan *et al.*⁷³ reportou dois complexos contendo tiossemicarbazonas atuando como ligantes em ponte via átomo de -S e cuja atividade frente à linhagem celular DU-145 é expressa em valores de IC₅₀ = 6,024 ± 0,509 µM e IC₅₀ = 6,251 ± 0,301 µM.

Por sua vez, o complexo metálico [Ag(L)(PPh₃)₂(NO₃)₂] (L = 2-acetilpiridina-*N*(4)-metil-3-tiossemicarbazona; PPh₃ = trifenilfosfina) demonstrado por Biswas *et al.*⁷⁶ apresentou seletiva atividade antiproliferativa contra células de câncer de fígado (Hepa1-6; murino) em concentração de 2 a 5 µM sem afetar as células sadias BRL-3A (fibroblasto de fígado) nas mesmas condições. O mecanismo de ação proposto para o composto inorgânico envolve a morte celular via apoptose⁷⁶.

Portanto, percebe-se que a complexação de ligantes bioativos, tais como phen e TSC, e que apresentem capacidade de coordenarem em quelato, assim como a utilização de um centro metálico que apresenta atividade biológica no organismo, pode resultar em um composto com elevada atividade antiproliferativa frente a células tumorais e potencialmente ser seletivo, não afetando dessa forma células sadias.

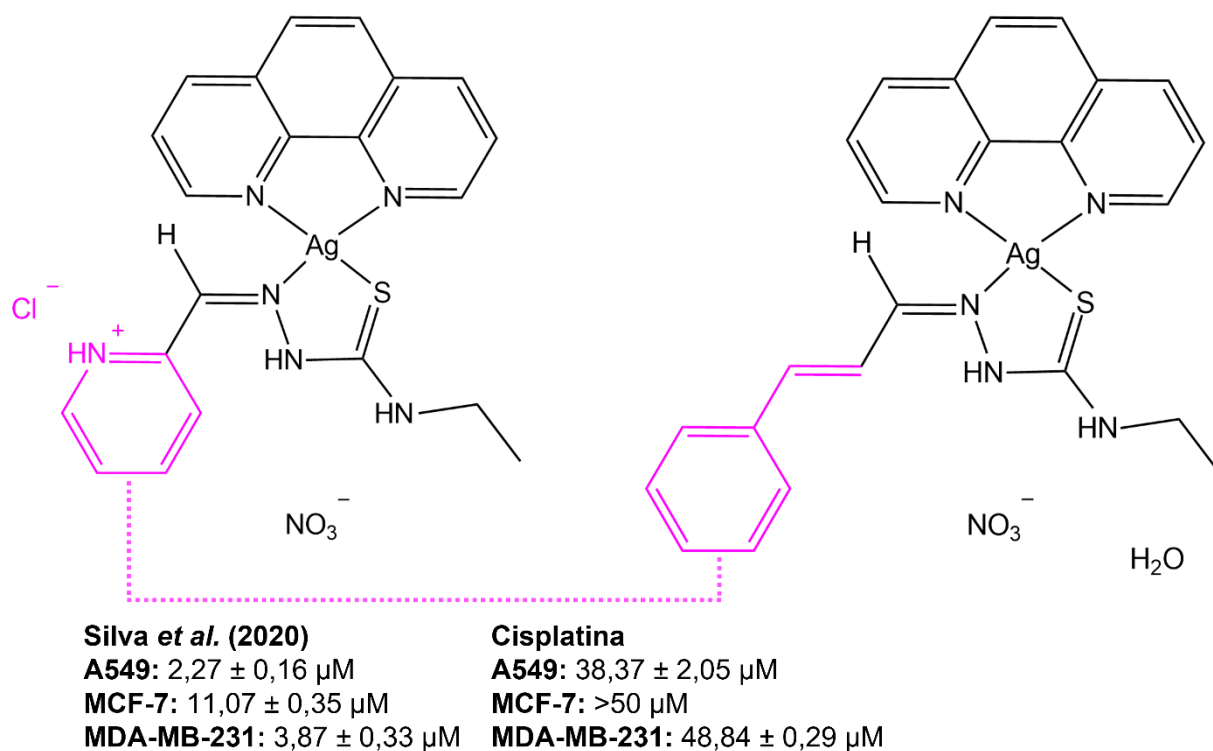
1.5 Hipótese

Silva *et al.*⁸¹ desenvolveu três complexos inéditos de fórmula geral [Ag(phen)(L)]NO₃, sendo L = 2-formilpiridina-*N*(4)-*R*-tiossemicarbazona, R = H, metil e etil. As espécies demonstraram maior citotoxicidade frente às linhagens celulares tumorais A549, MCF-7 e MDA-MB-231 em relação à cisplatina⁸¹. Em especial, para o substituinte 2-formilpiridina-*N*(4)-etil-tiossemicarbazona, os valores de IC₅₀ obtidos equivalem a 2,27 ± 0,16 µM (A549); 11,07 ± 0,35 µM (MCF-7); e 3,87 ± 0,33 µM (MDA-MB-231)⁸¹. Nessa mesma ordem, para a cisplatina, tem-se 38,37 ± 2,05 µM; >50 µM; e 48,84 ± 0,29 µM⁸¹. O composto inédito de Ag(I) apresentou seletividade de 3,1 para células humanas de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), enquanto a cisplatina tem SI de 0,6 nas mesmas condições (linhagem celular humana sadia MCF-10A)⁸¹. Foi sugerido que a morte celular seja via apoptose, em função ao aumento de

EROs e alteração no potencial de membrana mitocondrial ⁸¹. Ademais, os compostos apresentaram interação fraca com a molécula de DNA, indicando mecanismo de ação divergente ao da cisplatina ⁸¹.

Com o intuito de aumentar nosso conhecimento sobre relações estrutura-atividade de complexos de prata, neste trabalho, pretendemos substituir a 2-formilpiridina-*N*(4)-etil-tiossemicarbazona do complexo [Ag(phen)(L)]NO₃ pela tiossemicarbazona cinemaldeído (**cTSC** = *N*(4)-etil-cinamaldeído tiossemicarbazona). Dessa forma, será possível identificar se ao modificarmos a estrutura do composto inorgânico, haverá alterações na atividade biológica resultante. Logo, poderemos sugerir quais partes da molécula são importantes para a atividade antiproliferativa e quais não são.

Figura 11 – Modificações estruturais entre os compostos reportados por Silva *et al.* (2020) e o proposto neste trabalho ⁸¹.



Fonte: Autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho envolve a síntese, caracterização e avaliação do potencial antitumoral de um complexo metálico inédito de fórmula molecular $[\text{Ag}(\text{cTSC})(\text{phen})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, sendo cTSC = tiossemicarbazona derivada do cinemaldeído (*N*(4)-etil-cinamaldeído tiossemicarbazona) e phen = 1,10-fenantrolina.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização do ligante tiossemicarbazona cinemaldeído (**cTSC**) e do complexo metálico inédito $[\text{Ag}(\text{cTSC})(\text{phen})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**C1**).
- Avaliação da atividade antiproliferativa frente às linhagens celulares A2780cis, A549, MCF-7 e MRC-5.
- Investigação da interação entre **C1** e *ct*-DNA.

3 METODOLOGIA

3.1 Instrumentação

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) utilizando a transformada de Fourier foi estudada por meio da utilização de pastilhas de KBr e do espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific na região de 400 – 4000 cm^{-1} . Por sua vez, os estudos de RMN ^1H foram realizados no espectrômetro multinuclear BRUKER Avance III HD 600 (14, 1T). A condutividade molar foi determinada no condutivímetro DM 31 Digimed, solubilizando o complexo metálico de concentração 1 mm L^{-1} em DMSO ($\Lambda_m = 0,50 \mu\text{S cm}^{-2} \text{mol}^{-1}$). O espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific's Evolution Array UV-Visible foi utilizado para as medidas na região do UV-Vis. Utilizou-se do analisador elementar Perkin Elmer 2400 series II para a determinação de CHN% contendo um detector de condutividade térmica e baseando-se no método de Pregl-Dumas. Por fim, a espectrometria de massas usando a ionização por electrospray (ESI-MS) foi realizada por meio do espectrômetro Amazon speed ETD Bruker Daltonics, contendo o analisador de Ion Trap de baixa resolução. Ressalta-se que o equipamento utilizado para a obtenção do espectro de RMN ^1H é disponibilizado pelo laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao passo que as técnicas ESI-MS e análise elementar foram realizadas na Central Analítica da USP São Paulo.

Para as análises envolvendo dicroísmo circular, foi-se utilizado o espectropolarímetro J-815 da JASCO, localizado no laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Ademais, as medidas de fluorescência foram obtidas no mesmo equipamento, utilizando-se do módulo de detecção de fluorescência e do controle de temperatura Peltier.

3.2 Síntese

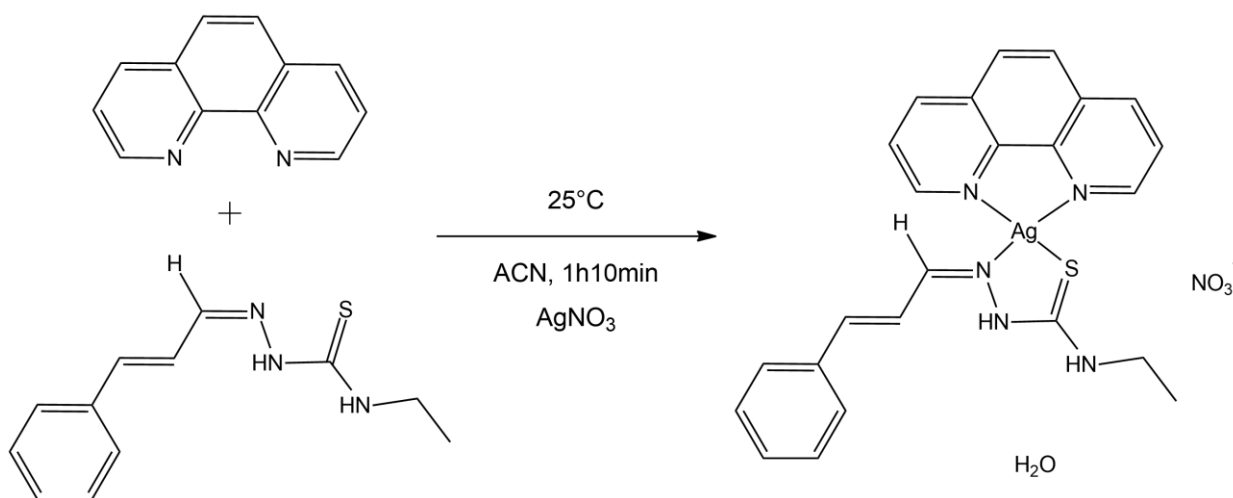
A tiossemicarbazona à base de cinemaldeído (**cTSC**) foi sintetizada segundo a metodologia previamente descrita na literatura ⁸². Resumidamente, em um balão de fundo redondo, suspendeu-se (N)4-etil-3-tiossemicarbazida ($m = 1,0000 \text{ g}$; $n = 8,39 \text{ mmol}$) em etanol. Em seguida, foi gotejado 1,100 mL de *trans*-cinemaldeído ($\tau = 99\%$;

$d = 1,050 \text{ g/mL}$; $n = 8,65 \text{ mmol}$) ao sistema. Adicionou-se 3 gotas de ácido acético a fim de acidificar o meio. O sistema foi mantido sob refluxo durante 3h e, posteriormente, resfriado a temperatura ambiente. Cristais amarelo-claros foram obtidos e filtrados a vácuo.

cTSC: Rendimento: 48%. IV (cm^{-1}): 3317 (m , $\nu\text{NH}_{\text{tioamida}}$); 3134 (m , $\nu\text{NH}_{\text{hidrazina}}$); 1556 (F , $\delta\text{NH} + \nu\text{C}=\text{N} + \nu\text{C}=\text{C}$); 804 (f , $\nu\text{C}=\text{S}$). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) (δ ppm; J Hz): 10,00 (1H, s); 7,73 (1H, d , 8); 7,51-7,26 (6H, m); 6,99-6,76 (2H, *porção AB*, $J = 6$, $J = 14$, $J = 16$); 3,80 (2H, dq , $J = 6$, $J = 7$); 1,32 (3H, t , $J = 7$).

Por sua vez, a síntese do complexo metálico **C1** (Figura 12) foi realizada conforme a metodologia reportada por Silva *et al.* (2020), contudo houve algumas alterações ⁸¹. Em suma, em um balão de fundo redondo protegido da luz, solubilizou-se AgNO_3 ($m = 70,1 \text{ mg}$; $n = 0,41 \text{ mmol}$) em acetonitrila (ACN). Em seguida, gotejou-se uma solução de phen ($m = 75,0 \text{ mg}$; $n = 0,42 \text{ mmol}$) em ACN ao sistema. Após 10 minutos de agitação a temperatura ambiente, solubilizou-se, com o mesmo solvente, a tiossemicarbazona cinemaldeído **cTSC** ($m = 97,3 \text{ mg}$; $n = 0,42 \text{ mmol}$) e gotejou-se a mesma no sistema. O sistema foi mantido sob agitação durante 1h. Filtrou-se os precipitados amarelo-claros a vácuo.

Figura 12 - Esquema geral da síntese do complexo metálico **C1**.



Fonte: Autor.

C1: Rendimento: 67%. Anal. calc. $C_{24}H_{25}AgN_6O_4S$ (%): C: 47,93; H: 4,19; N: 13,97. Encontrado (%): C: 47,82; H: 3,96; N: 12,53. $\Lambda_M = 34,3 \mu S \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. ESI-MS [M^+]: calc. m/z : 522,07. Encontrado m/z : 522,14. IV (cm^{-1}): 3449 (m , ν_{NH} tioamida); 3230 (m , ν_{NH} hidrazina); 1589 (f , $\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{C}=\text{N}} + \nu_{\text{C}=\text{C}}$); 804 (m , $\nu_{\text{C}=\text{S}}$); 1427 (m , ν_{aNO_2} nitrato); 1384 (F , ν_{sNO_2} nitrato). ^1H RMN (DMSO d_6) (δ ppm; J Hz): 11,77 (1H, s br); 9,15 (2H, dd , J = 2, J = 5); 8,98 (1H, s br); 8,78 (2H, dd , J = 2, J = 8); 8,22 (2H, s); 8,02 (2H, dd , J = 5, J = 8); 3,67 (2H, br); 1,20 (3H, t , J = 7).

3.3 Caracterização

O ligante **cTSC** foi caracterizado pelas técnicas de IV e RMN ^1H em CDCl_3 . A caracterização do complexo metálico inédito (**C1**) envolveu as técnicas espectroscópicas de IV, UV-Vis, RMN ^1H , ESI-MS. Ademais, determinou-se, quantitativamente, a taxa de C, H e N na espécie de estudo por meio da análise elementar, assim como a condutividade molar.

3.4 Estudos de estabilidade em solução

Visando avaliar se o complexo se mantém íntegro em solução durante 48h, preparou-se dois sistemas: o primeiro contendo apenas DMSO, e o segundo, uma mistura de 80% DMSO e 20% tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,4). Os espectros foram obtidos em quadruplicata por meio da espectroscopia na região do UV-Vis. **C1** teve concentração fixa em $1,25 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.5 Ensaios biológicos

3.5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa

Em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar) e a fim de determinar a citotoxicidade do complexo metálico **C1** frente a linhagens celulares, utilizou-se o meio de cultura DMEM para o crescimento de células A549 (câncer de pulmão) e MRC5 (fibroblasto de pulmão; não tumoral), e meio RPMI-1640 para A2780cis (câncer de ovário; resistente à cisplatina) e MCF-7 (câncer de mama). Ambos os meios foram previamente suplementados com 10% (v/v) de soro

fetal bovino (FBS). As células foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

Com o auxílio do contador automático TC20 (Bio Rad) e do corante Azul de Tripiano, realizou-se a contagem da suspensão e, em seguida, adicionou-se alíquotas de 150 µL ($1,5 \times 10^4$ células) a placas de 96 poços. Após 24h de incubação, adicionou-se, em cada poço, 0,75 µL da molécula de estudo solubilizada em DMSO, tendo como concentração final, 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50; 75,00; 150,00 µmol L⁻¹. O sistema foi novamente incubado durante 48h.

Adicionou-se 50 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio) com concentração equivalente a 1 mg mL⁻¹ a cada poço e após 4h de incubação, a solução foi retirada dos poços e adicionou-se 100 µL de Álcool Isopropílico com 10% de DMSO. Utilizou-se do leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo EPOCH para a leitura das medidas de absorvância, e os softwares Excel 360 e GraphPadPrism 8.0.2 para tratamento de dados.

3.5.2 Ensaio de Interação com DNA

3.5.2.1 *Titulação Espectrofotométrica*

No espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific's Evolution Array UV-Visible de feixe único, o branco foi realizado em uma cubeta contendo 2940 µL de tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,4) e 60 µL de DMSO. De forma similar, obteve-se o espectro de absorção da região do UV-Vis de um sistema contendo 2940 µL de tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,4) e 60 µL de **C1** (1×10^3 mol L⁻¹) solubilizado em DMSO, cuja concentração final foi de 2×10^5 mol L⁻¹. Foram realizadas adições sucessivas de *ct*-DNA (1×10^3 mol L⁻¹) até que a biomacromolécula atingisse concentração final de 6×10^5 mol L⁻¹.

3.5.2.2 *Ensaio de Competição com Hoechst 33258 e Laranja de Tiazol*

Utilizando-se do módulo de fluorescência do espectropolarímetro J-815 da JASCO e o módulo de Peltier a 25°C, em uma mistura contendo *ct*-DNA ($6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) solubilizado em tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,4) e a sonda de interesse (Laranja de Tiazol/Hoechst 33258; $6,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), adicionou-se **C1** a volumes constantes a fim de obter concentração final entre 0 e $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Ressalta-se que o comprimento de onda de excitação para o Hoechst 33258 equivale a 350 nm e a leitura do espectro foi realizada entre 358-660 nm. Por sua vez, para o Laranja de Tiazol, $\lambda_{exc} = 480$ nm e a faixa de leitura compreende a 500-680 nm.

3.5.2.3 Dicroísmo Circular

Por meio do espectropolarímetro J-815 da JASCO e o módulo de Peltier a 25°C, realizou-se as medidas de dicroísmo circular de um sistema incubado durante 24h em banho-maria a 37°C contendo *ct*-DNA ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) solubilizado em tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,4) e volumes crescentes de **C1** (0-19,6 μ mol L⁻¹).

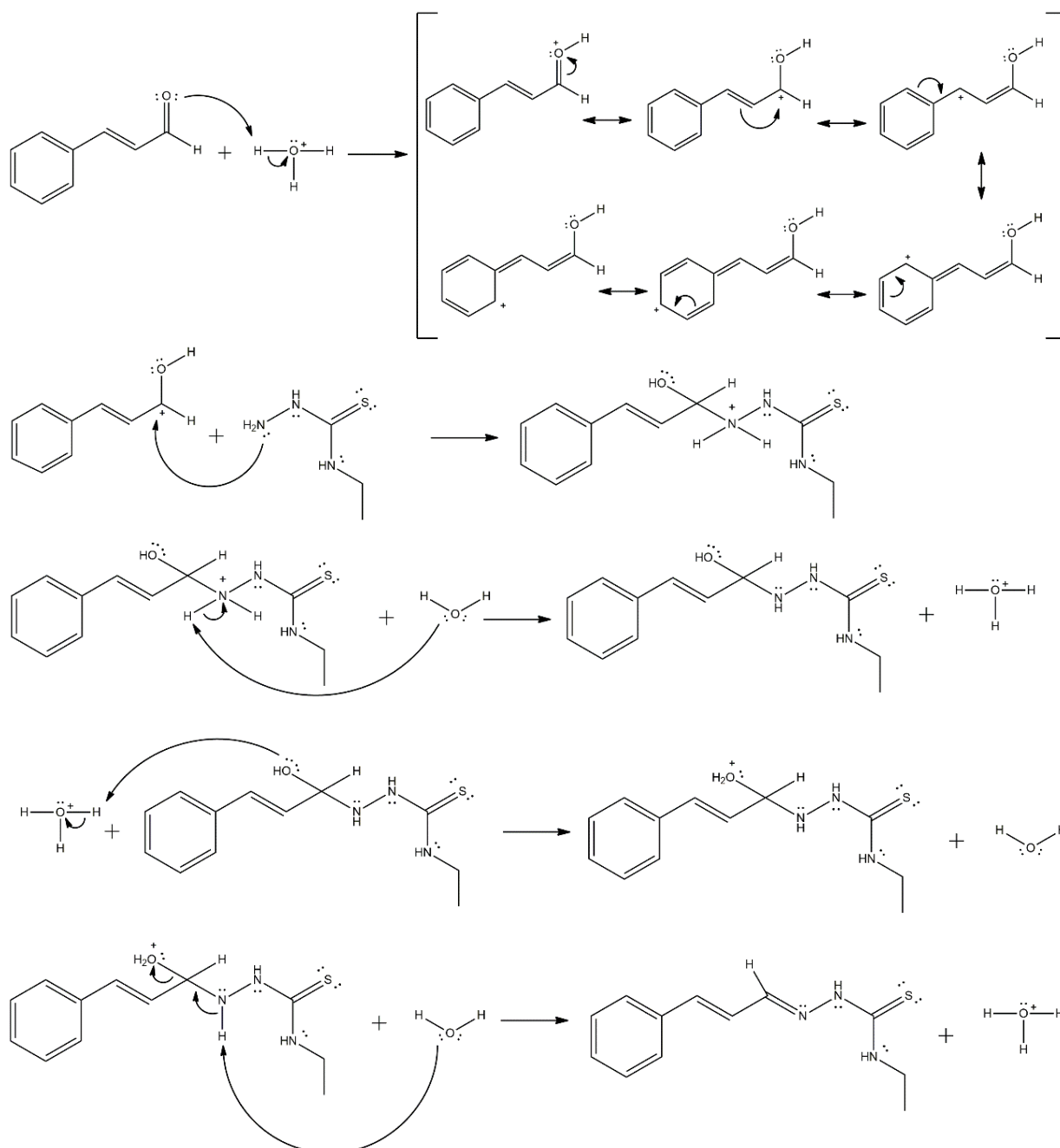
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Química

O cinemaldeído é uma molécula orgânica encontrada na forma de um óleo na casca das árvores de gênero *Cinnamomum*, além de ser considerada um potente agente antineoplásico ⁸³⁻⁸⁵. Segundo Al-Hrout *et al.* (2018), 40% das espécies aprovadas para uso clínico pela agência Food and Drug Administration (FDA) nos EUA são derivadas de produtos naturais ⁸⁶. Isto se deve à sua baixa toxicidade frente às células saudáveis e a consequente diminuição de possíveis efeitos colaterais ⁸⁶.

A reação entre o *trans*-cinemaldeído e a tiossemicarbazida é caracterizada como uma condensação aldólica, cujo fundamento deve-se à adição nucleofílica e a subsequente liberação de uma molécula de água ⁸⁷. O nitrogênio N(1) da tiossemicarbazida realiza um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do cinemaldeído, cuja densidade eletrônica é parcialmente positiva devido ao efeito indutivo provocado pelo elemento mais eletronegativo, oxigênio. A reação é favorecida em meio ácido, uma vez que a protonação do oxigênio do fragmento carbonílico resulta na formação do grupo substituinte $-H_2O^+$, o qual é um excelente grupo abandonador. Os orbitais atômicos envolvidos nessa reação são os localizados no HOMO do nucleófilo (tiossemicarbazida) e no LUMO do eletrófilo (cinemaldeído).

Figura 13 - Mecanismo de reação proposto para a formação da tiossemicarbazona cinemaldeído cTSC.



Fonte: LAZZARINI, A. B. (2019) ⁸².

Para a síntese do complexo **C1**, utilizou-se AgNO_3 como precursor metálico, uma vez que o grupo NO_3^- não se coordenada facilmente ao centro metálico de estudo. Isso ocorre, pois os átomos de oxigênios, os quais são mais eletronegativos do que o nitrogênio, deixam o átomo central com densidade eletrônica parcialmente positiva,

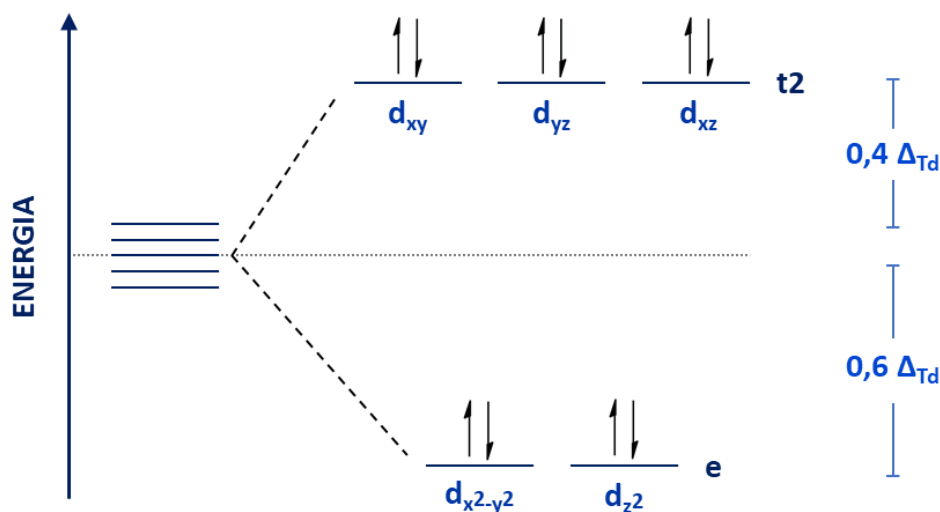
dificultando assim a formação da ligação coordenada por meio do -N. Além disso, a coordenação não seria favorável via átomo de oxigênio, uma vez que o mesmo é uma base dura, enquanto a prata(I) é um ácido mole, logo a ligação formada não seria termodinamicamente forte segundo a teoria ácido-base de Pearson (HSAB). Portanto, há baixa interferência do íon nitrato na coordenação dos ligantes phen e TSC ⁸⁸.

Por sua vez, a utilização da acetonitrila como solvente deve-se à solubilidade dos reagentes neste solvente, e a insolubilidade do complexo de interesse, logo é possível, facilmente, isolar **C1** do sistema por meio de uma filtração. Ademais, por mais que a acetonitrila possa atuar como um ligante em determinadas condições, a molécula se coordena menos facilmente em relação a outros solventes, e.g. DMSO e água ⁸⁸.

O composto **C1** foi sintetizado com proporção 1:1:1 entre os reagentes AgNO₃, phen e **cTSC**, objetivando a coordenação de ambos os ligantes de maneira bidentada com o centro metálico. A fenantrolina apresenta dois átomos de nitrogênio disponíveis para a formação da ligação coordenada (*N,N*-). Por sua vez, para a tiossemicarbazona cinemaldeído, têm-se o nitrogênio imínico e o enxofre da tioamida (*N,S*-).

Nesse sistema, a prata(I) apresenta geometria tetraédrica, uma vez que não apresenta energia de estabilização do campo cristalino (Figura 14). O composto obtido não se decompõe na presença de luz.

Figura 14 – Diagrama de desdobramento do campo cristalino para a Ag(I) com geometria tetraédrica.



$$EECC = (-0,6\Delta_{Td} \times 4) + (0,4\Delta_{Td} \times 6) = 0$$

Fonte: Autor.

4.2 Caracterização

4.2.1 Análise Elementar

Ao aquecer um composto a 900°C e, posteriormente, a 750°C, resultando nas moléculas H₂O, CO₂ e N₂, pode-se determinar as taxas de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN%) na amostra original ⁴⁷. Para o complexo metálico **C1**, encontra-se na Tabela 1 as porcentagens obtidas experimentalmente e as calculadas de forma teórica.

Tabela 1 - Valores de CHN% para o **C1**.

	%C	%H	%N
Calculado	47,93	4,19	13,97
Experimental	47,82	3,96	12,53

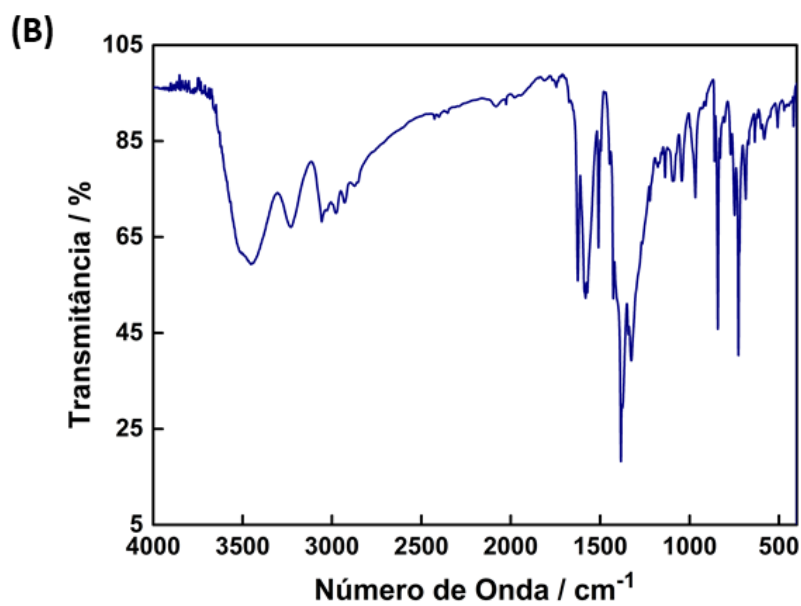
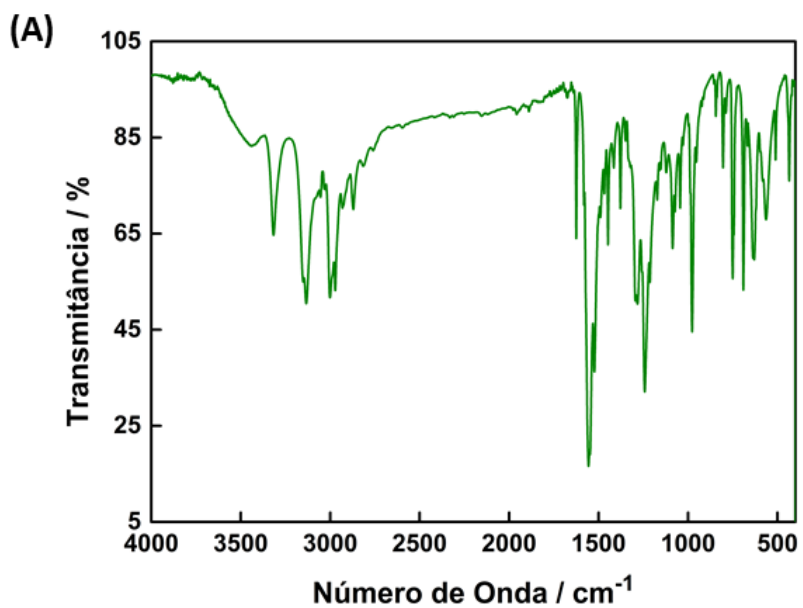
Fonte: Autor.

Uma vez que os valores obtidos corroboram com os esperados teoricamente, conjuntamente com as demais técnicas de caracterização que serão descritas, conclui-se que a espécie inédita sintetizada contém um complexo catiônico, o nitrato como contra-íon e uma molécula de H₂O. Ademais, determina-se que a fórmula molecular seja C₂₄H₂₅AgN₆O₄S.

4.2.2 Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para a tiossemicarbazona cinamaldeído (**cTSC**) e complexo metálico correspondente (**C1**) encontram-se na Figura 15 e suas respectivas atribuições na Tabela 2.

Figura 15 - Espectros vibracionais na região do infravermelho para **(A)** o ligante tiossemicarbazona cinemaldeído **(B)** o complexo à base de Ag^+ .



Fonte: Autor.

Tabela 2 - Atribuição dos sinais de absorção na região do infravermelho para **cTSC** e **C1**.

Número de Onda / cm^{-1}		
	cTSC	C1
νNH tioamida	3317, <i>m</i>	3449, <i>m</i>
νNH hidrazina	3134, <i>m</i>	3230, <i>m</i>
$\delta\text{NH} + \nu\text{C}=\text{N} + \nu\text{C}=\text{C}$	1556, <i>F</i>	1589, <i>f</i>
$\nu\text{C}=\text{S}$	804, <i>f</i>	804, <i>m</i>
$\nu_a\text{NO}_2$ nitrato	-	1427, <i>m</i>
$\nu_s\text{NO}_2$ nitrato	-	1384, <i>F</i>

Fonte: Autor.

A vibração de ligações químicas pode ser mensurada por meio da espectroscopia vibracional na região do infravermelho ⁸⁹. Diferentes ligações entre diversos átomos em distintos ambientes químicos correspondem a diferentes números de onda e, portanto, a diferentes padrões no espectro de infravermelho ⁸⁹. Dessa forma, a utilização da técnica espectroscópica para a caracterização de compostos inorgânicos mostra-se essencial, uma vez que o produto gerado na reação de complexação apresentará um espectro de absorção diferente dos reagentes.

Todos os sinais obtidos no espectro no infravermelho de **cTSC** condizem com os reportados por Tan *et al.* (2020), logo conclui-se que o ligante sintetizado corresponde à tiossemicarbazona cinemaldeído de interesse, contudo as atribuições foram realizadas de acordo com Lobana e colaboradores (2009) ^{71; 90}.

Ao comparar-se as bandas obtidas no espectro vibracional na região do infravermelho de **C1** em relação a **cTSC**, percebe-se que os sinais referentes à tiossemicarbazona, após complexação, aparecem nas faixas propostas por Lobana *et al.* ⁷¹ quando tais ligantes coordenam-se em sua forma neutra. Em especial, destacam-se os sinais relacionados ao hidrogênio do fragmento hidrazínico em 3230 cm^{-1} , à inalteração da banda em 804 cm^{-1} referente à ligação $\text{C}=\text{S}$, a qual comprova a coordenação da tiossemicarbazona via átomo de enxofre, e ao pequeno aumento no deslocamento de 1556 cm^{-1} para 1589 cm^{-1} devido aos estiramentos δNH , $\nu\text{C}=\text{N}$ e $\nu\text{C}=\text{C}$, que por sua vez relaciona-se à coordenação do nitrogênio imínico da TSC ⁹¹.

Assim como é comprovado pelas demais técnicas de caracterização, o complexo contém uma molécula de H₂O em seu retículo cristalino, logo percebe-se a banda alargada referente ao estiramento ν_{OH} em 3515 cm⁻¹. Ademais, ressalta-se também a presença dos sinais em 1427 cm⁻¹ e 1384 cm⁻¹, os quais comprovam a presença de nitrato iônico na estrutura do complexo ^{92; 93; 94}.

Ligações metal-ligante, tal como Ag-S, se encontram em regiões inferiores a 400 cm⁻¹, logo são indetectáveis por meio da técnica em questão ⁹⁵.

4.2.3 Condutividade

O valor de condutividade determinada para **1** a 25°C encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Condutividade para o complexo **C1** em DMSO.

	K / $\mu\text{S cm}^{-1}$	Λ_M / $\mu\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$
1	34,3	34,3

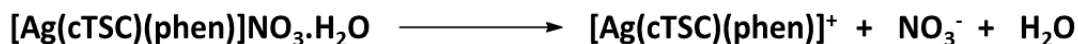
Fonte: Autor.

A aplicação de um campo eletrostático tem como consequência a migração de cátions e ânions em uma solução ^{96; 97}. Tal migração resulta no efeito denominado condutividade elétrica, a qual é função da temperatura, viscosidade do solvente, concentração do eletrólito, raio iônico, mobilidade e carga do íon ⁹⁶. A determinação da condutividade molar tem sua importância fundamentada na avaliação do tipo de eletrólito que descreve o complexo metálico de estudo.

A relação entre tipo de eletrólito e condutividade molar de espécies em DMSO é descrito por Velho (2006), logo ao comparar o valor obtido para **C1** ($\Lambda_M = 34,3 \mu\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$), conclui-se que o composto à base de Ag(I) é um eletrólito 1:1 ⁹⁶. Dessa forma, conclui-se que o grupo nitrato (NO₃⁻), proveniente do reagente nitrato de prata, é o contra íon do complexo metálico.

A reação de dissociação proposta para **C1** em DMSO encontra-se na Figura 16.

Figura 16 – Reação de dissociação proposta para C1 em DMSO.

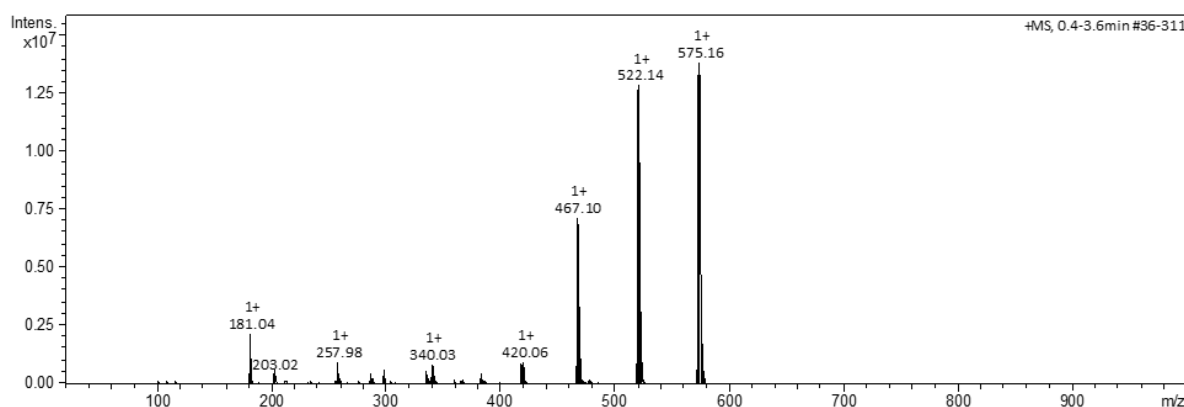


Fonte: Autor.

4.2.4 Espectrometria de Massas

O espectro de massas para o complexo **C1** está ilustrado na Figura 17.

Figura 17 – Espectro de IES(+)-EM de **C1** em uma mistura de DMSO e MetOH.

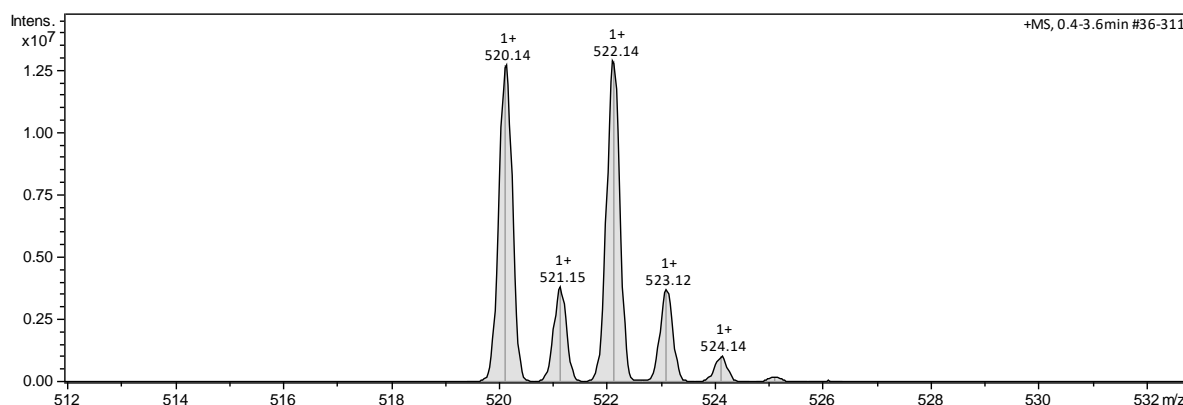


Fonte: Autor.

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica destrutiva que visa separar íons gasosos em função da relação massa-carga (m/z)^{47; 98}. Para biomoléculas de alto peso molecular, substâncias lábeis e, assim como no caso de **C1**, não voláteis, a fonte de ionização por electrospray (IES-MS) mostra-se vantajosa, uma vez que se utiliza, inicialmente, um solvente apropriado para a solubilização da espécie de estudo⁸⁹.

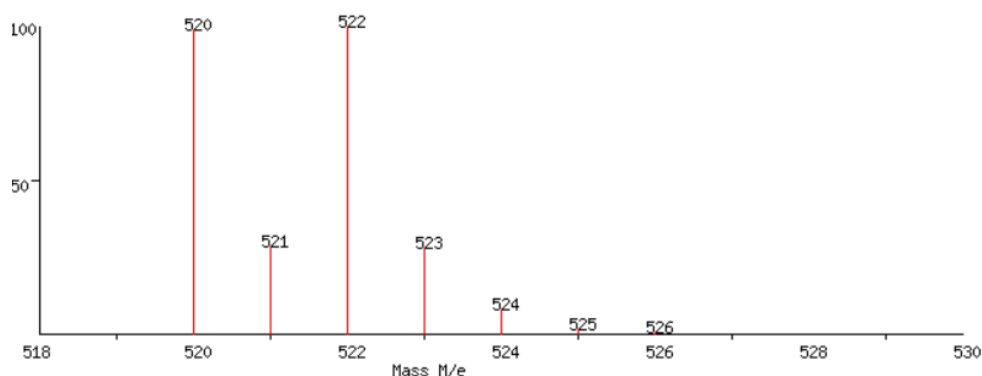
Para a espécie **C1**, o sinal em 522,14 (m/z) deve-se ao íon $[\text{Ag}(\text{phen})\text{cTSC}]^+$, comprovando a estrutura proposta. Ao ampliar a região entre 512 e 532 (m/z), tem-se o espectro ilustrado na Figura 18. Os sinais encontrados experimentalmente condizem com os obtido de forma teórica por meio da plataforma Scientific Instrument Services (SIS) by Adaptas Solutions (Figura 19)⁹⁹. Ressalta-se que a presença de diversos sinais representa cada isótopo existente da prata (^{107}Ag e ^{109}Ag), nitrogênio (^{14}N e ^{15}N), e carbono (^{12}C e ^{13}C), sendo que quanto maior a abundância do mesmo, maior a intensidade do respectivo sinal.

Figura 18 – Espectro experimental de IES(+)-EM de **C1** na região de 512 a 532 (m/z).



Fonte: Autor.

Figura 19 - Espectro teórico proposto pela plataforma Scientific Instrument Services (SIS) by Adaptas Solutions de IES(+)-EM de **C1** na região de 512 a 532 (m/z).



Fonte: Autor.

Ademais, outros fragmentos que possivelmente são originados a partir da quebra do complexo, como, em 181,04 (m/z), à fenantrolina, em 340,03 (m/z) ao fragmento $[\text{Ag}(\text{cTSC})]^+$, em 467,20 (m/z) ao bisquelato $[\text{Ag}(\text{phen})_2]^+$ e em 575,16 (m/z) ao complexo $[\text{Ag}(\text{cTSC})_2]^+$.

4.2.5 RMN ¹H

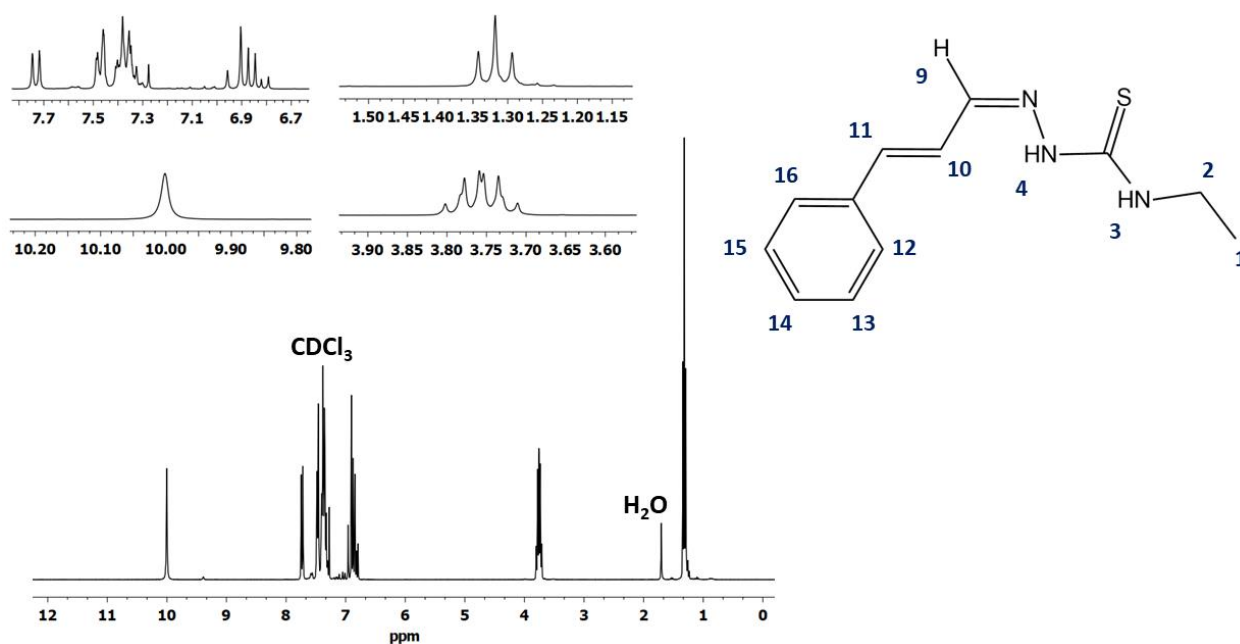
Os spins nucleares orientam-se aleatoriamente no espaço com níveis de energia (α e β) degenerados entre si ^{100; 101; 102}. Porém, na presença de um campo magnético (B_0), há a quebra da degenerescência e a consequente formação de dois níveis de energia ^{89; 101}. O nível de menor energia relaciona-se ao alinhamento dos spins

nucleares a B_0 e é denominado α ^{89; 101}. Em contrapartida, o nível β apresenta maior energia e refere-se à quando os spins nucleares se orientam opostos ao campo magnético ^{89; 101}. A diferença entre ambos os estados energéticos equivale a ΔE ¹⁰¹. Ademais, α apresenta uma população superior em relação a β no equilíbrio ⁸⁹.

Quando é aplicado um campo magnético adicional (campo magnético induzido, B_1), há a indução de transições entre os níveis energéticos ⁸⁹. Tais transições que resultam no espectro de Ressonância Magnética Nuclear ⁸⁹.

O espectro de RMN utilizando o núcleo de ^1H para o ligante **cTSC** encontra-se na Figura 20 e suas respectivas atribuições na Tabela 4.

Figura 20 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 para o ligante tiossemicarbazona cinamaldeído (**cTSC**).



Fonte: Autor.

Tabela 4 - Atribuição dos sinais de ^1H para o ligante **cTSC**.

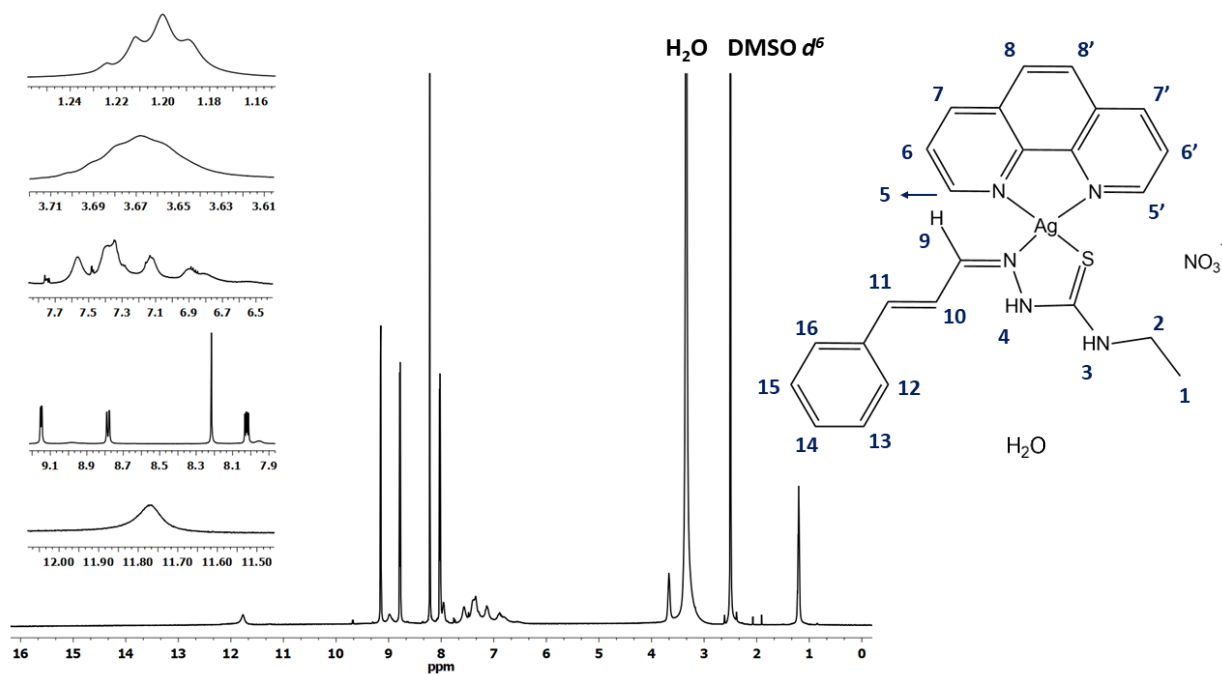
	Multiplicidade	Hidrogênios Equivalentes	δ / ppm	J / Hz
H₁	<i>t</i>	3H	1,32	7
H₂	<i>dq</i>	2H	3,80	6 / 7
H₃	<i>m</i>	6H	7,51 - 7,26	-
H₄	<i>s</i>	1H	10,00	-
H₉	<i>d</i> (porção X)	1H	7,73	8
H₁₀	(porção AB)	2H	6,99 - 6,76	6 / 14 / 16
H₁₁				
H₁₂	<i>m</i>	6H	7,51 - 7,26	-
H₁₃				
H₁₄				
H₁₅				
H₁₆				

Fonte: Autor.

O espectro obtido confere com os dados reportados na literatura para o ligante **cTSC**, portanto o ligante sintetizado corresponde à molécula de interesse ¹⁰³.

Por sua vez, para **C1**, tem-se o espectro de RMN ilustrado na Figura 21 e suas respectivas atribuições na Tabela 5.

Figura 21 - Espectro de RMN ^1H em $\text{DMSO } d^6$ para o complexo contendo Ag(I) , phen e tiossemicarbazona cinamaldeído (**C1**).



Fonte: Autor.

Tabela 5 - Atribuição dos sinais de ^1H para o complexo C1.

	Multiplicidade	Hidrogênios Equivalentes	δ / ppm	J / Hz
H ₁	<i>t</i>	3H	1,20	7
H ₂	<i>br</i>	2H	3,67	-
H ₃	<i>s, br</i>	1H	8,98	-
H ₄	<i>s, br</i>	1H	11,77	-
H ₅ = H _{5'}	<i>dd</i>	2H	9,15	2 / 5
H ₆ = H _{6'}	<i>dd</i>	2H	8,78	2 / 8
H ₇ = H _{7'}	<i>dd</i>	2H	8,02	5 / 8
H ₈ = H _{8'}	<i>s</i>	2H	8,22	-
H ₉				
H ₁₀				
H ₁₁				
H ₁₂				
H ₁₃	<i>m</i>	8H	6,4 – 7,9	-
H ₁₄				
H ₁₅				
H ₁₆				

Fonte: Autor.

Com base no espectro de RMN de núcleo de ^1H e em suas respectivas atribuições, percebe-se que houve a complexação de ambos os ligantes fenantrolina e tiossemicarbazona ao centro metálico Ag(I) na proporção 1:1:1.

Os hidrogênios da fenantrolina H₅ e H_{5'} são magneticamente equivalentes, da mesma forma que H₆ e H_{6'}, H₇ e H_{7'}, e H₈ e H_{8'}. Isso ocorre uma vez que o ambiente

químico da fenantrolina é simétrico, tanto como molécula orgânica, como ligante coordenado. Tal fato evidencia a coordenação da fenantrolina de forma bidentada.

O hidrogênio do fragmento hidrazínico é o que apresenta maior deslocamento químico, uma vez que é o que apresenta menor blindagem magnética. Após coordenação, aumenta-se tal desblindagem, uma vez que parte da densidade eletrônica do ligante é doada via ligação sigma ao centro metálico. A presença de tal sinal no espectro de **C1** ($\delta = 11,77$ ppm) comprova que a tiossemicarbazona coordenou-se de forma neutra à prata(I).

Ressalta-se também que a somatória das integrais do espectro corresponde ao número de hidrogênios do complexo metálico, assim como as respectivas multiplicidades para cada átomo de ^1H da molécula conferem com as esperadas de forma teórica, logo é possível concluir que a reação resultou na formação apenas do complexo de interesse, com significativo nível de pureza.

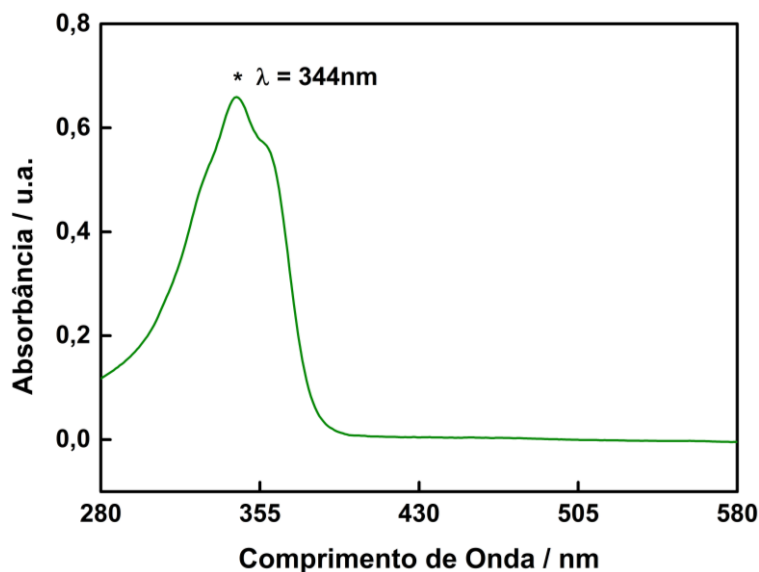
4.2.6 UV-Vis

Quando uma molécula absorve energia, os elétrons são excitados e ocupam um nível de maior energia ^{47; 89}. A probabilidade de tal transição eletrônica ocorrer pode ser mensurada por meio da determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ), calculado segundo a Lei de Lambert-Beer (Equação 1), que por sua vez, prediz a linearidade entre a absorvância de uma espécie (A) e a sua respectiva concentração (C) quando o caminho óptico (b) é constante ^{47; 89}.

$$A = \epsilon b C \quad (\text{Equação 1})$$

O espectro de absorção na região do infravermelho para a espécie **cTSC** encontra-se na Figura 22.

Figura 22 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o ligante tiossemicarbazona cinemaldeído com concentração $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO.

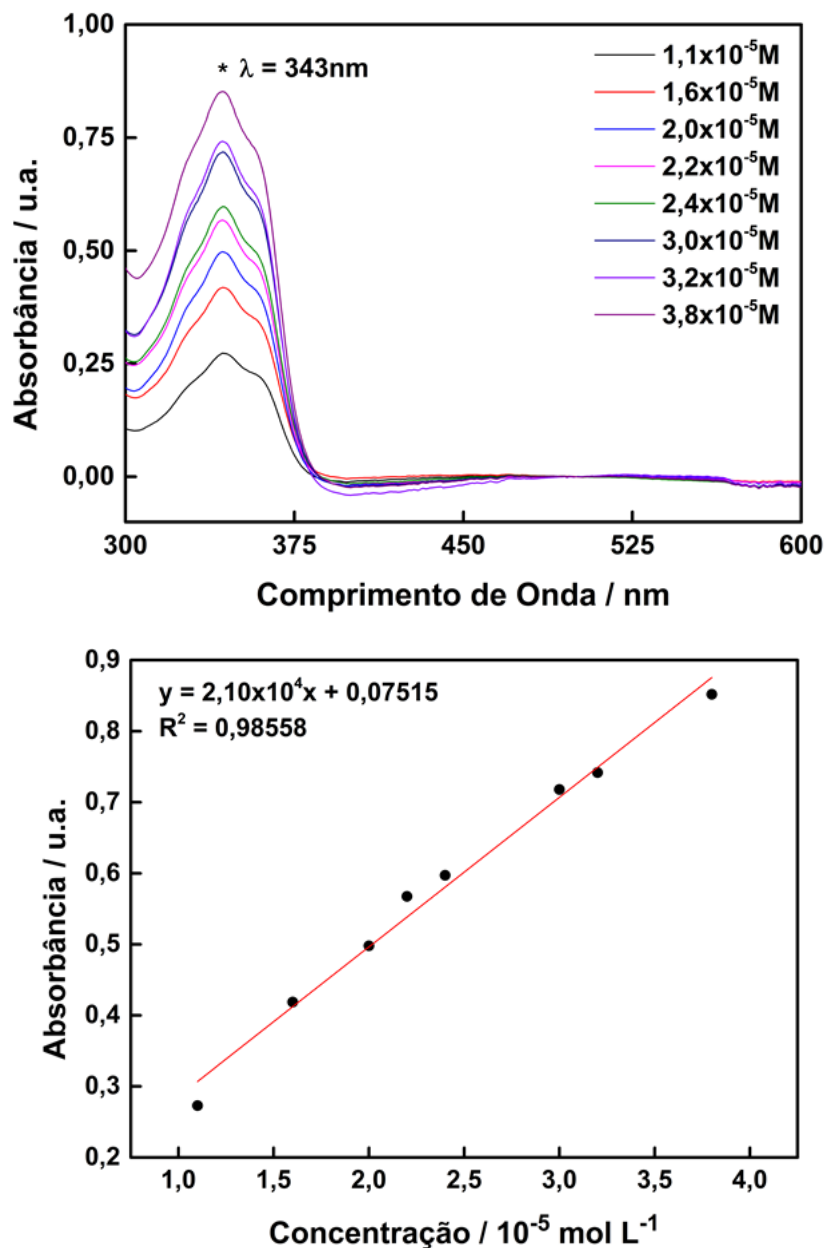


Fonte: Autor.

A banda de alta intensidade em 344 nm deve-se a transições eletrônicas permitidas pelas Regras de Seleção. Tem-se as transições $\pi\text{-}\pi^*$, $n\text{-}\pi^*$ e $n\text{-}\sigma^*$ devido ao anel aromático do cinemaldeído e dos pares de elétrons isolados, como no nitrogênio dos fragmentos hidrazínico e tioamida ^{89; 104}. Para **C1** (Figura 23), tem-se, na mesma faixa espectral ($\lambda = 343 \text{ nm}$), as transições eletrônicas $\pi\text{-}\pi^*$, $n\text{-}\pi^*$ e $n\text{-}\sigma^*$, assim como referentes à transferência de carga, a qual é uma transição permitida ^{47; 89}.

A fim de determinar o coeficiente de absorvidade molar para o complexo metálico inédito, utilizou-se da Lei de Lambert-Beer (Equação 1) e mediu-se a absorbância de **C1** em distintas concentrações.

Figura 23 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o complexo **C1** em DMSO e a sua respectiva linearização segundo a Lei de Lambert-Beer.



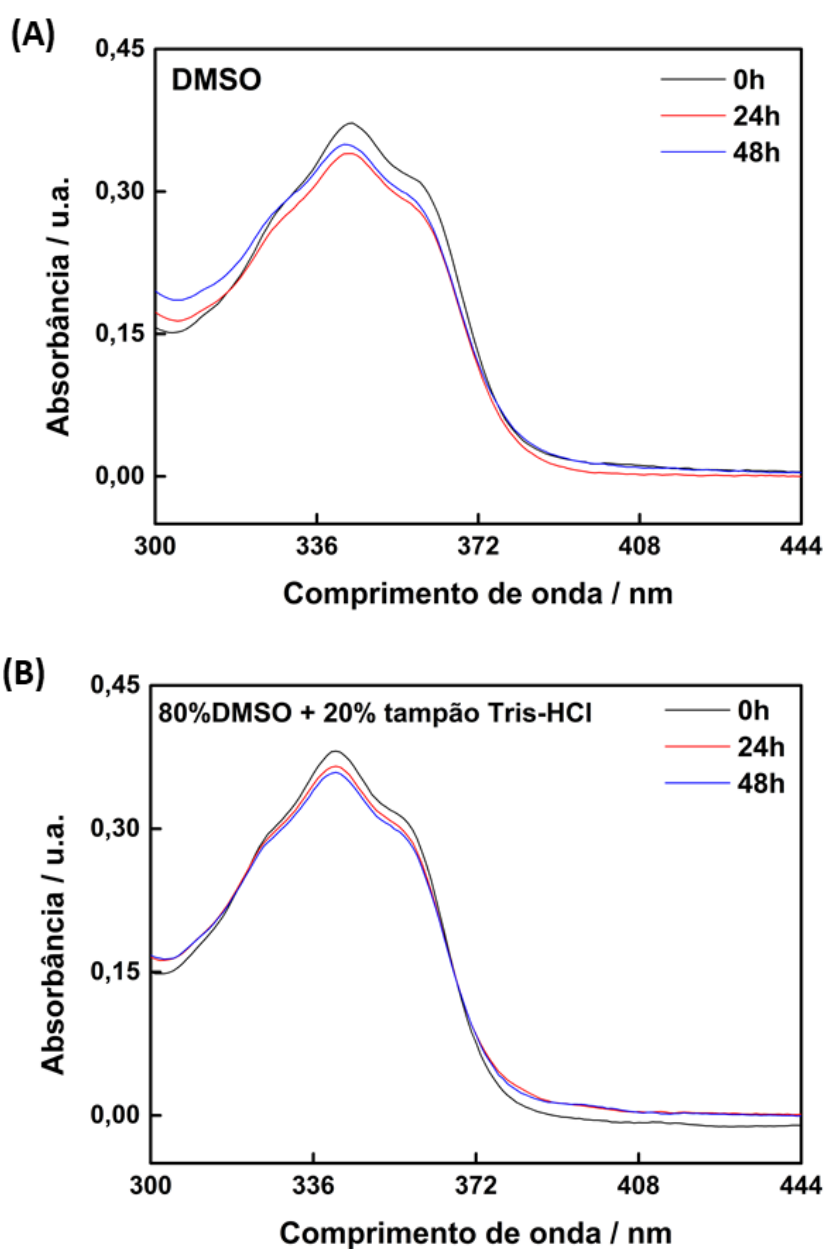
Fonte: Autor.

Uma vez que o coeficiente angular da reta obtida equivale ao produto entre ϵ e b ($b = 1,0\text{ cm}$), tem-se que $\epsilon_{343\text{ nm}} = 2,10 \times 10^4\text{ L cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$.

4.2.7 Estudos de Estabilidade em Solução

Por meio da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), monitorou-se, durante 48 horas, a absorbância de uma solução de **C1** a $1,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em DMSO e em uma mistura de 80% DMSO e 20% tampão tris-HCl (pH 7,3).

Figura 24 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o complexo **C1** nos tempos de 0h, 24h e 48h em (A) DMSO (B) 80% DMSO e 20% tampão tris-HCl.



Fonte: Autor.

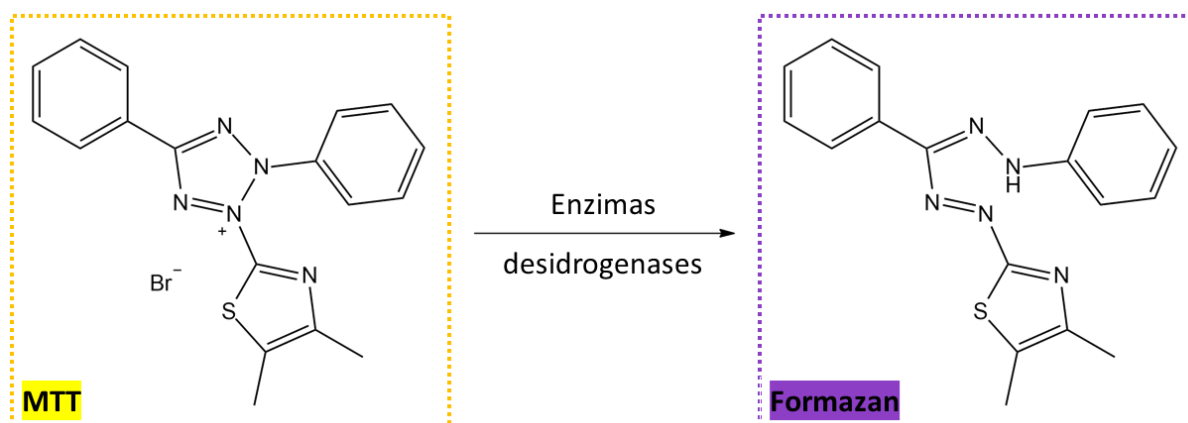
Como ilustrado na Figura 24, percebe-se que durante o tempo de estudo, em DMSO, o complexo **C1** apresentou uma variação de absorbância de 0,03 em 344 nm. De forma similar, para a mistura contendo 80% DMSO e 20% tampão tris-HCl (Figura 24), em 341 nm, houve uma variação de absorbância de 0,02 entre 0h e 48h. Portanto, por meio da técnica em questão, propõe-se que **C1** mantém-se íntegro durante 48h em sistemas contendo ambos o solvente e a mistura de solventes de estudo, uma vez que não houve significativa variação da absorbância nem deslocamento do sinal obtido. Contudo, estudos adicionais de estabilidade, em especial por meio da espectroscopia de RMN ^1H , se fazem igualmente necessários.

4.3 Ensaios Biológicos

4.3.1 Avaliação da atividade antiproliferativa

A viabilidade celular e a citotoxicidade podem ser investigadas por meio do ensaio colorimétrico de MTT ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A técnica consiste na redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio), cuja coloração é amarela, à molécula formazan, que por sua vez, é roxo (Figura 25) ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A reação ocorre em função das células viáveis, uma vez que as mesmas contêm, em suas mitocôndrias, enzimas desidrogenases, as quais são oxirredutases ¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Dessa forma, quanto menor for a concentração de formazan gerado, menor a quantidade de células viáveis e, portanto, maior a inibição da linhagem celular pelo composto de estudo ^{106; 107}.

Figura 25 – Reação de redução do MTT a formazan.



Fonte: Autor.

Os valores de viabilidade celular podem ser expressos por meio da atividade antiproliferativa da molécula de estudo, ou seja, o valor de IC₅₀ representa a concentração necessária da espécie que inibe 50% da linhagem celular, sejam estas tumorais ou sadias.

Para o complexo **C1**, os valores obtidos de IC₅₀ frente às linhagens celulares humanas A2780cis (câncer de ovário; resistente à cisplatina), A549 (câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de mama) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão; não tumoral) encontram-se na Tabela 6. Utilizou-se a cisplatina como referência.

Tabela 6 – Atividade antiproliferativa do ligante **cTSC** e do complexo metálico **C1** frente às linhagens celulares tumorais A2780cis, A549 e MCF-7 e não tumoral MRC-5.

Composto	IC ₅₀ / μM			
	A2780cis	A549	MCF-7	MRC-5
cTSC	-	>100	>100	>100
C1	2,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	2,6 ± 0,2	5,2 ± 0,1
Cisplatina	16,8 ± 0,6	13,0 ± 0,5	8,6 ± 0,8	21,6 ± 0,8

Fonte: Autor.

Ao comparar os valores determinados de IC₅₀ para **cTSC** e **C1** frente às linhagens celulares de estudo, percebe-se que a coordenação do ligante tiossemicarbazona apresentou, como resultado, um aumento da atividade antiproliferativa da espécie, uma vez que moléculas orgânicas inativas (IC₅₀ > 100 μM) tornam-se ativas (IC₅₀ = 2,2 – 5,5 μM).

O complexo inédito à base de Ag(I) mostrou-se mais promissor em relação à cisplatina em todas as linhagens tumorais de estudo (IC₅₀ **C1** = 2,2 – 5,5 μM; IC₅₀ cisplatina = 8,6 – 16,8 μM). Tal tendência é observada uma vez que é necessária uma menor concentração da espécie para a inibição de 50% da linhagem de células. Entretanto, ao comparar os valores de IC₅₀ determinados para **C1** em comparação com os complexos análogos reportados por Silva *et al.*⁸¹, em especial, o com substituinte etil na tiossemicarbazona, para a linhagens celulares A549 e MCF-7, percebe-se que **C1**

apresenta maior atividade antiproliferativa para câncer de mama, ao passo que os o outro complexo foi mais ativos para câncer de pulmão (Tabela 7). Mesmo assim, destaca-se que o complexo metálico contendo a tiossemicarbazona derivada do cinemaldeído foi promissor frente a todas as linhagens tumorais de estudo ($IC_{50} < 10 \mu M$)⁹¹. Uma vez que a esfera de coordenação dos complexos previamente reportados e **C1** difere-se apenas devido ao aldeído precursor da tiossemicarbazona, sugere-se que o ligante TSC possa estar diretamente relacionado ao efeito antitumoral do complexo metálico resultante. Logo, propõe-se que o ligante tiossemicarbazona possa ser o grupo farmacofórico do composto inorgânico.

Tabela 7 – Comparação dos valores de IC_{50} para **C1** e o composto reportado por Silva *et al.*⁸¹ (**3**) ($[Ag(phen)(L)]NO_3$, L = 2-formilpiridina-*N*(4)-etil-tiossemicarbazona).

Composto	$IC_{50} / \mu M$	
	A549	MCF-7
C1	$5,5 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$
3	$2,27 \pm 0,16$	$11,07 \pm 0,35$

Fonte: Autor.

Destaca-se também que **C1** se mostrou ativo frente à linhagem de células de câncer de ovário resistentes à cisplatina, A2780cis. Esse fato indica que o modo de ação do complexo metálico inédito é divergente do mecanismo de ação proposto para a cisplatina no organismo¹⁰⁹. Objetivando obter maior entendimento acerca das possíveis interações entre **C1** e possíveis alvos biológicos, utilizou-se de técnicas espectroscópicas como titulação espectrofotométrica, dicroísmo circular e supressão da fluorescência.

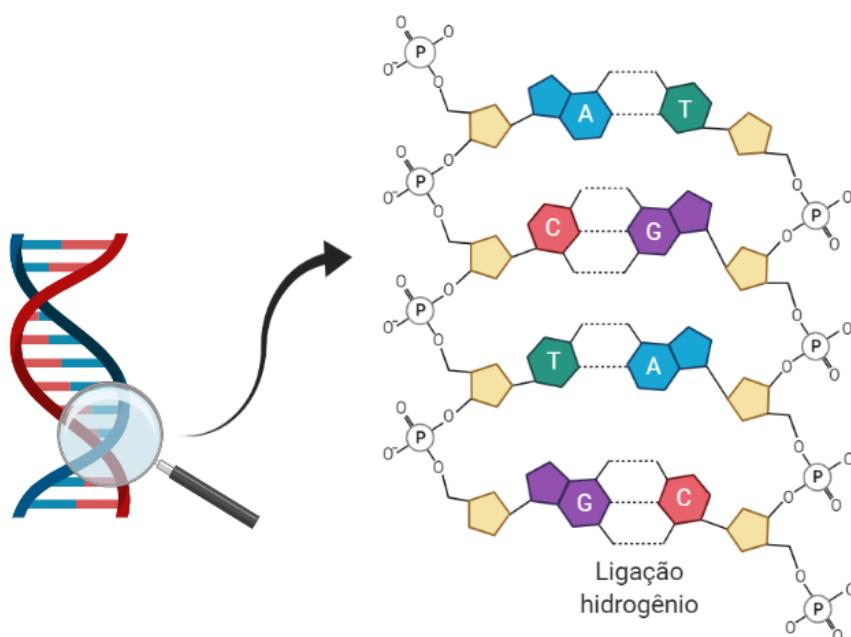
4.3.2 Ensaio de Interação com DNA

Tendo em vista que o mecanismo de ação dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer à base de Pt(II) envolve, como principal alvo biológico, o DNA, a biomacromolécula é comumente escolhida durante o desenvolvimento de um novo

potencial agente antineoplásico, especialmente complexos metálicos, objetivando avaliar a possibilidade de apresentar interações covalentes e/ou não-covalentes com a molécula de estudo ^{21; 22; 110}. Ademais, a grande gama de informações estruturais disponíveis sobre o DNA, assim como há diversas possibilidades de modos de interação com o mesmo, tornam-no um excelente alvo de estudo ¹¹¹.

O DNA (Figura 26) é constituído por unidades monoméricas denominadas nucleotídeos e que apresentam, em sua estrutura, um grupo fosfato, uma unidade de açúcar (pentose), que no caso é a desoxirribose (2'-desoxi-D-ribose), e uma base nitrogenada, as quais podem ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T) ^{112; 113; 114; 115}. As bases nitrogenadas de duas fitas diferentes de polinucleotídeos interagem entre si por meio de interação hidrogênio, especificamente a adenina com a timina e a guanina com a citosina ^{31; 112; 113; 116; 117}.

Figura 26 – Componentes da estrutura do DNA.



Fonte: Autor; criado com BioRender.com.

A dupla fita da biomacromolécula pode apresentar diferentes características em função da sua conformação, principalmente devido à pentose, cuja alteração pode ocorrer em função de fatores como sequência dos pares de bases nitrogenadas, concentração de sais, e.g. NaCl, e presença de espécies que possam formar ligações

e/ou interações^{31; 118; 119}. Como exemplo, a variação na quantidade relativa de água próxima à molécula de DNA pode influenciar na relação entre os contatos não covalentes (porção hidrofóbica) e interações hidrofílicas, as quais estabilizam, majoritariamente, a estrutura secundária da biomolécula¹²⁰. Conseqüentemente, o DNA poderá ser encontrado em diferentes formas e, com isso, poderá apresentar diferentes interações com espécies bioativas como complexos metálicos.

A conformação que o DNA é comumente encontrado em sua forma nativa, ou seja, a conformação responsável por suas propriedades biológicas, é a forma B (DNA-B)^{31; 112}. Nestas condições, a umidade relativa é elevada, com valores superiores a 92%, assim como há a presença de metais alcalinos em sua forma catiônica, como o Na⁺ por exemplo^{112; 118}. O DNA-B apresenta uma dupla hélice e diâmetro de 20Å¹¹². A região a qual as fitas localizam-se próximas umas a outra é denominada sulco menor; em contrapartida, quando em distâncias superiores, tem-se o sulco maior¹²¹.

A moderada acidez da biomolécula e a conseqüente característica de poliânion deve-se aos grupamentos fosfato que são negativamente carregados¹¹². No caso, a conformação B privilegia que as regiões hidrofílicas fiquem mais expostas às moléculas de água, minimizando assim a repulsão eletrônica dos grupos negativamente carregados entre si, ao passo que as interações entre as bases nitrogenadas ficam localizadas em um ambiente menos hidrofílico e, dessa forma, não precisam competir pela ligação de hidrogênio com a água^{112; 113; 120}.

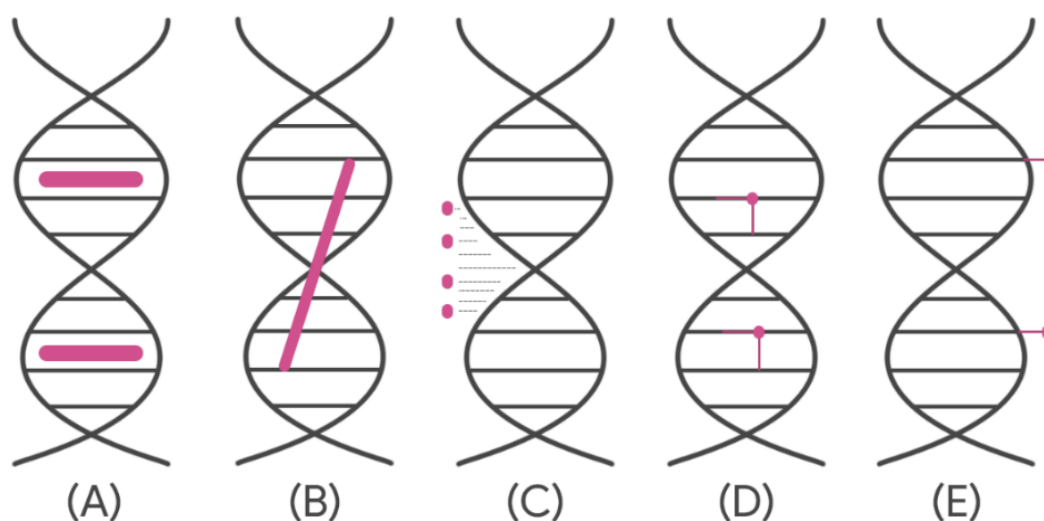
Entretanto, é necessário ressaltar que o dinamismo na estrutura do DNA permite que haja transições da forma DNA-B para outras, e.g. DNA-A e DNA-Z¹¹³. Algumas semelhanças e diferenças entre as formas são que a forma A do DNA é encontrada em ambientes com baixos teores de umidade relativa, apresenta sulcos maior e menor com largura semelhante, e assim como a forma B, também desvia a luz para a direita^{31; 113; 116; 118}. Por sua vez, a forma mais energética, DNA- Z, desvia a luz para a esquerda, e pode ter sua formação induzida na presença de concentrações superiores a 3,5 mol L⁻¹ de NaCl ou a 50% de etanol^{31; 116; 119; 122}.

A principal função do DNA deve-se ao armazenamento genético, visando a sobrevivência do indivíduo e, conseqüentemente, da espécie^{115; 123; 124}. Fatores como a acidez/basicidade do meio, temperatura e a presença de espécies que possam interagir de forma covalente ou não covalente com a biomolécula podem acarretar na

perda da sua função e, em alguns casos, resultar na morte celular, assim como os fármacos à base de Pt(II) (Seção 1.2) ^{112; 123}. Dessa forma, uma estratégia no desenvolvimento de potenciais novos fármacos deve-se à inibição de processos como a transcrição e a replicação de células não-sadias, destacando-se as células tumorais, uma vez que apresentam elevada cinética de proliferação ^{121; 125}.

Técnicas espectroscópicas podem ser de grande valia no monitoramento das propriedades do DNA em função de interações com moléculas bioativas ¹²⁶. Diferentes modos de interação entre novos promissores agentes antineoplásicos e a biomacromolécula podem resultar em comportamentos díspares no ensaio de estudo ^{81; 121; 124}. Destacam-se, como principais modos de interação entre moléculas bioativas e o DNA, a intercalação entre os pares de bases nitrogenadas (Figura 27A), a interação via sulcos maior e/ou menor (Figura 27B), interação eletrostática com os grupos fosfato (Figura 27C) e ligação covalente, seja via base nitrogenada pelo átomo de nitrogênio (Figura 27D) e/ou grupo fosfato pelo oxigênio (Figura 27E) ^{46; 124; 126; 127}.

Figura 27 - Modos de interação entre moléculas bioativas e DNA.



Fonte: LAZZARINI, A. B. (2019) ⁸².

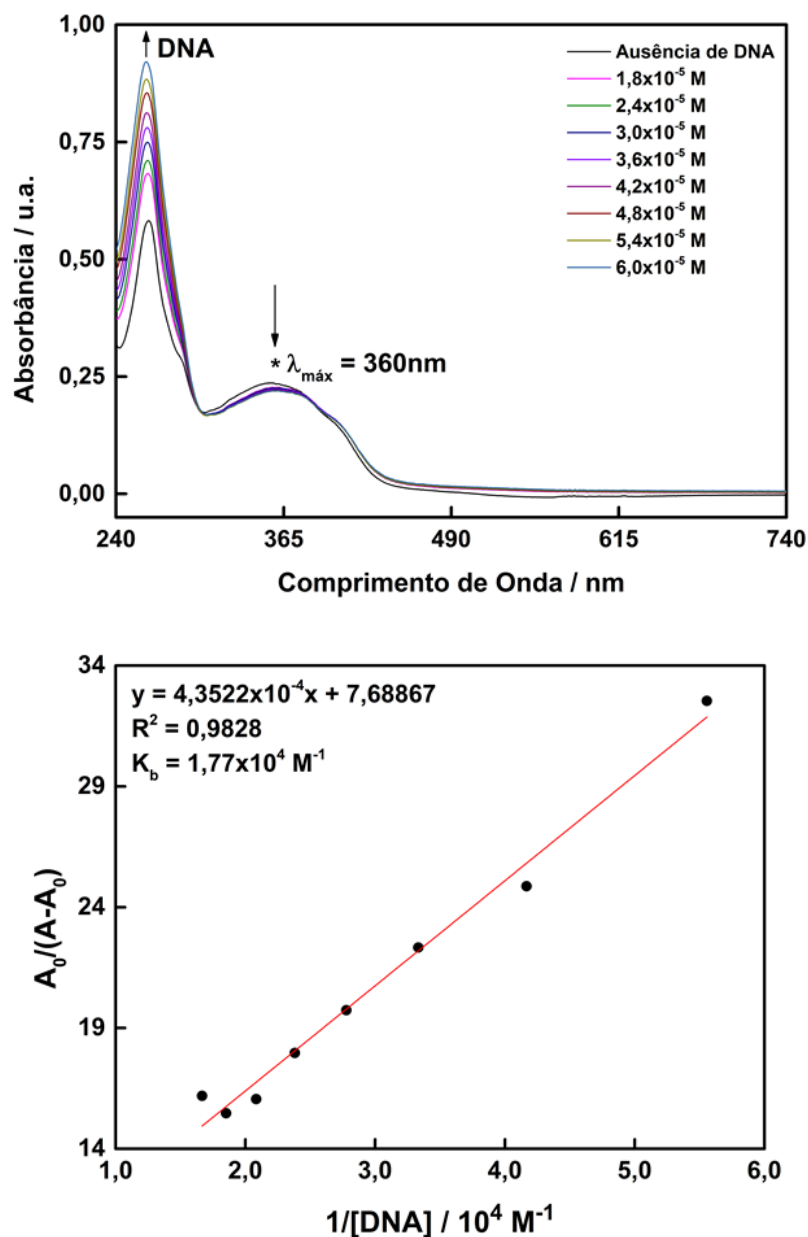
4.3.2.1 Titulação Espectrofotométrica

A titulação espectrofotométrica tem como fundamento a alteração do espectro de absorção da espécie de estudo em função do aumento da concentração de DNA no sistema ^{124; 128}. Como exemplo, o perfil de um agente intercalador, em geral, está

associado ao deslocamento batocrômico, ou seja, ao deslocamento para regiões menos energéticas do espectro, em conjunto com a diminuição das bandas de máxima absorvância (hipocromismo) ^{124; 126; 127}. Esse efeito é consequência da interação do tipo empilhamento π entre o orbital antiligante (π^*) do anel aromático da espécie de estudo e os orbitais ligantes (π) dos pares de bases nitrogenadas do DNA, resultando assim na diminuição da energia atrelada à transição eletrônica entre os orbitais π - π^* (batocromismo). Da mesma forma, como o orbital π dos pares de bases nitrogenados estão interagindo com a espécie bioativa, esse orbital encontra-se menos populado em termos de densidade eletrônica, logo diminui-se a probabilidade de transição eletrônica entre os orbitais π - π^* entre duas bases nitrogenadas adjacentes. Como consequência, observa-se o fenômeno de hipocromismo ^{124; 127; 129}. Segundo Rehman *et al.*¹²⁴, intercaladores clássicos podem apresentar valores superiores a 35% de hipocromismo e 15 nm de deslocamento batocrômico.

A fim de iniciar os estudos acerca dos possíveis modos de interação entre o DNA e **C1**, realizou-se o ensaio de titulação espectrofotométrica com DNA. Como ilustrado na Figura 28, observou-se um hipocromismo de 6% em 360 nm em relação à absorvância do complexo na ausência e na presença (60 μ M) de DNA. Ressalta-se que a banda do complexo não apresentou deslocamento batocrômico nem hipsocrômico.

Figura 28 - Espectro de absorção da região do UV-Vis do complexo **C1** com concentração de DNA variando entre 0-60 μ M e a sua respectiva linearização segundo a Equação de Benesi.



Fonte: Autor.

A Equação de Benesi-Hildebrand, possibilitou observar, de forma mais clara, a correlação entre a absorbância de **C1** e a concentração de DNA (Equação 2). Na equação em questão, A_0 e ϵ_G equivalem, respectivamente, à absorbância e ao coeficiente de absorvidade molar do sistema na ausência de DNA, ao passo que A e ϵ_{H-G} devem-se à absorbância e ao coeficiente de absorvidade molar do sistema na presença do DNA. A concentração de DNA é expressa como $[\text{DNA}]$.

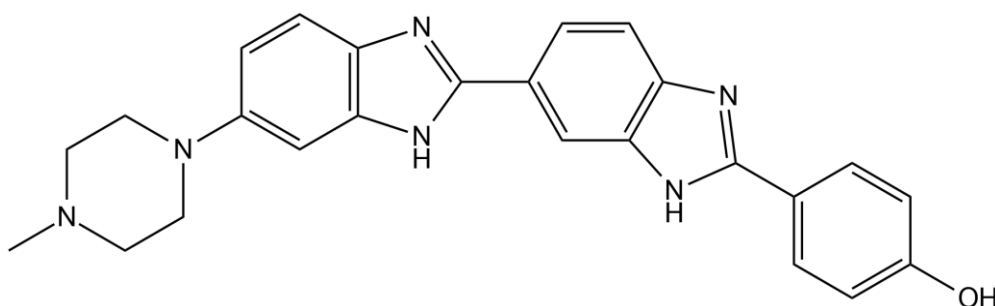
$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \left(\frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \times \frac{1}{K_b [DNA]} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

A reta linearizada obtida ($R^2 = 0,9828$) possibilitou a determinação da constante de formação K_b para o complexo metálico de estudo, a qual equivale a $1,77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Figura 28). Ao comparar o valor obtido com sondas intercaladoras clássicas, assim como brometo de etídio ($K_b = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), percebe-se que **C1** apresenta uma interação de natureza fraca com a biomacromolécula em questão ¹³⁰.

4.3.2.2 Ensaio de Competição com Hoechst 33258

A utilização de sondas para investigação se há interação entre uma espécie e o DNA tem-se mostrado uma estratégia promissora. O Hoechst 33258 (H33258) (Figura 29) é uma sonda que se liga especificamente ao sulco menor do B-DNA em regiões que apresentam quatro ou cinco regiões adjacentes contendo os pares de bases nitrogenadas adenina-timina (A-T), por meio de interações do tipo eletrostática, van der Waals e ligação hidrogênio ¹³¹⁻¹³³. Estudos demonstram que a interação entre a biomacromolécula e H33258 resulta na inibição do modo de ação de enzimas DNA topoisomerases ^{131; 134-136}.

Figura 29 – Fórmula estrutural Hoechst 33258.

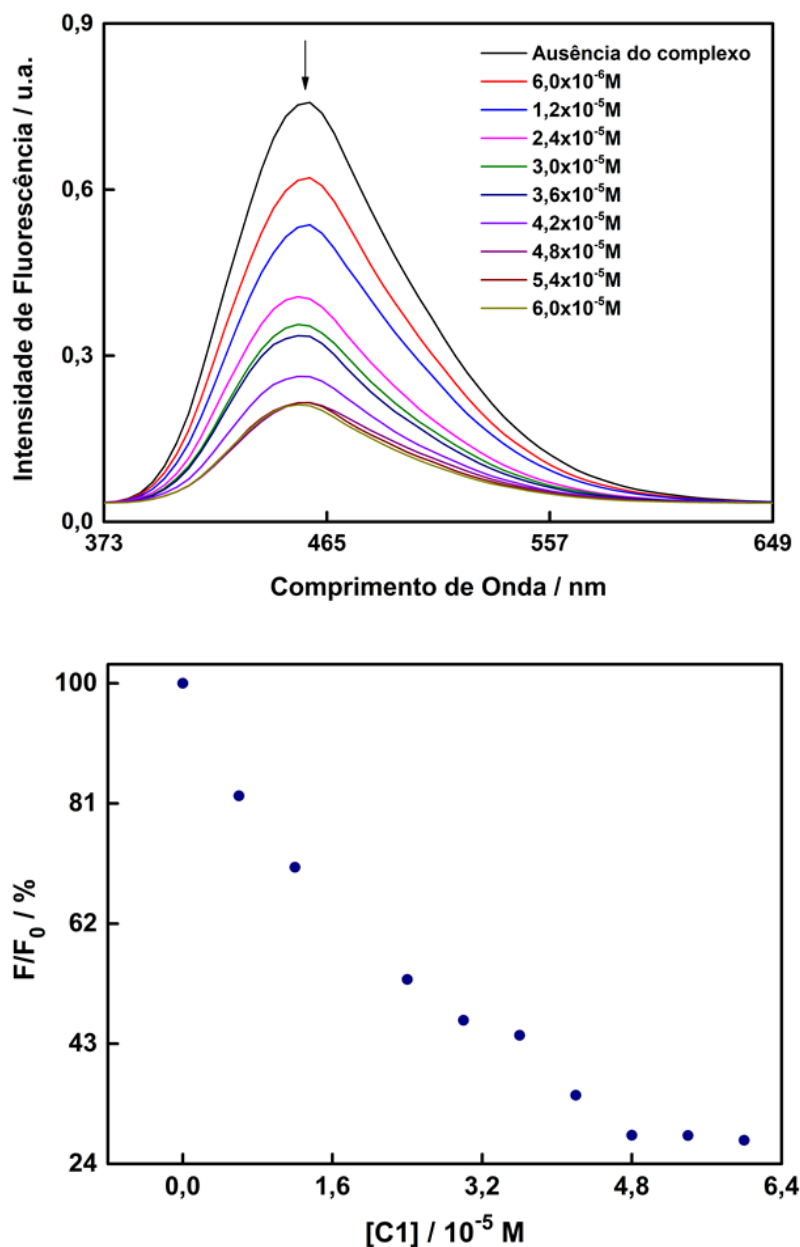


Fonte: Autor.

A utilização do Hoechst 33258 como meio de investigação da interação de novas espécies com DNA deve-se à potencialização da emissão de fluorescência resultante

quando formado o complexo H33258-DNA ¹²⁸. Dessa forma, a fluorescência de um sistema contendo a sonda e a biomolécula de interesse é avaliada conforme adiciona-se **C1** (0-60 μM) (Figura 30).

Figura 30 - Espectro de emissão de fluorescência do Hoechst 33258-DNA com concentrações de **C1** variando entre 0-60 μM .



Fonte: Autor.

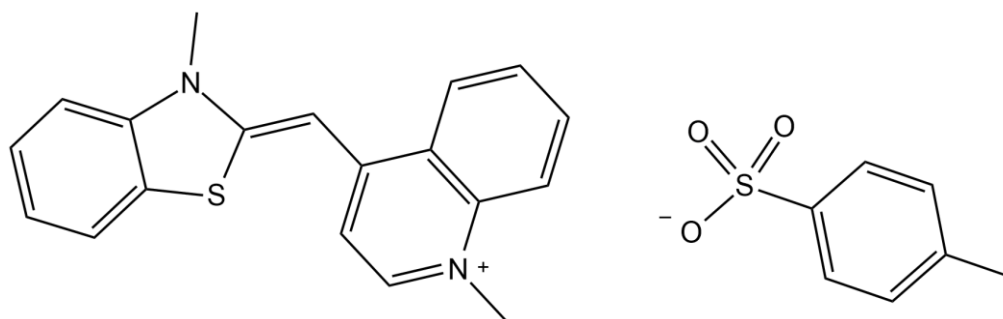
O complexo metálico suprimiu 72% da fluorescência da espécie H33258-DNA em 458 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$), indicando que a espécie de estudo consegue deslocar o

Hoechst 33258 do sulco menor do DNA, seja por interação direta entre **C1** e o sulco menor ou por meio de outro modo de interação que resulta na alteração da conformação da biomacromolécula e o consequente deslocamento da sonda ¹³⁷. Destaca-se também que, uma vez que o valor de supressão da fluorescência é inferior a 100%, mesmo na presença de excesso do complexo, conclui-se que a força de interação entre **C1** e a biomacromolécula é inferior à apresentada pela sonda com o DNA ^{137; 138}.

4.3.2.3 Ensaio de Competição com Laranja de Tiazol

O Laranja de Tiazol (TO) (Figura 31) é uma molécula que atua, majoritariamente, como intercaladora entre os pares de bases nitrogenadas do DNA ¹³⁹. O TO apresenta baixa intensidade fluorescência quando sozinha, porém a espécie TO-DNA pode potencializar tal intensidade em fatores superiores a 3000 ¹³⁹⁻¹⁴¹.

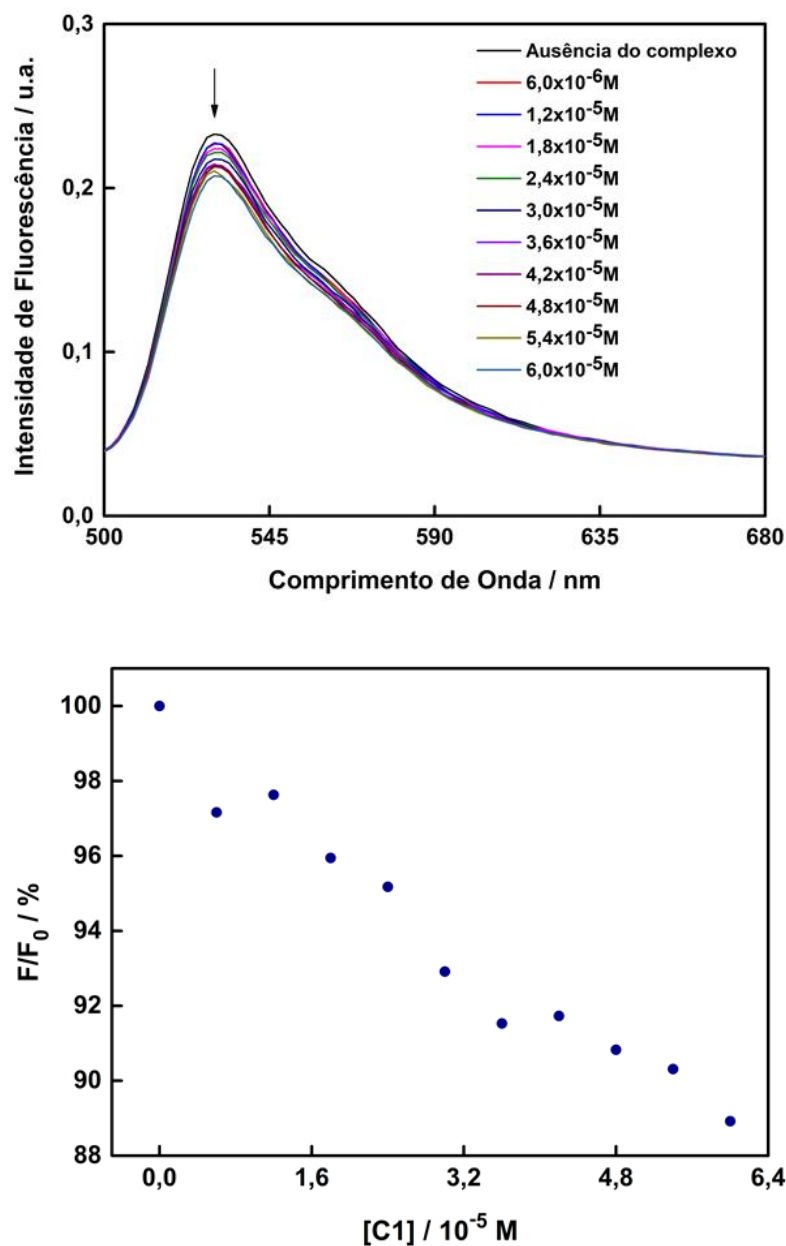
Figura 31 - Fórmula estrutural Laranja de Tiazol (TO).



Fonte: Autor.

Em um sistema contendo Laranja de Tiazol, DNA e adições crescentes de **C1** (0-60 μM), o complexo metálico conseguiu suprimir 11% da intensidade de fluorescência da espécie TO-DNA em 530 nm quando excitado em 480 nm (Figura 32). Face ao exposto, percebe-se que **C1** interage fracamente com a molécula de DNA.

Figura 32 - Espectro de emissão de fluorescência do TO-DNA com concentrações de **C1** variando entre 0-60 μM .



Fonte: Autor.

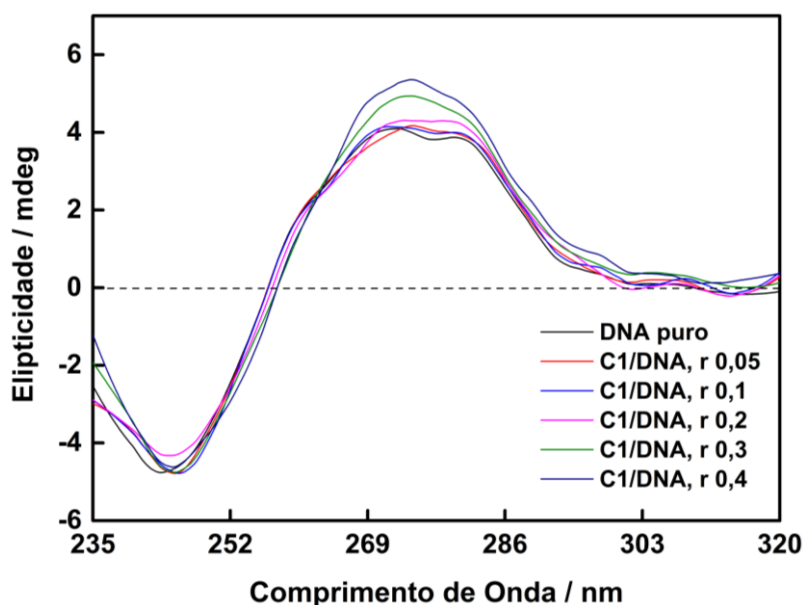
4.3.2.4 Dicroísmo Circular

Quando uma luz circularmente polarizada é incidida sob uma molécula quiral, a mesma pode absorver de formas diferentes as radiações eletromagnéticas correspondentes à polarização pela direita e pela esquerda¹⁴². Tal assimetria de absorção que resulta no sinal obtido por meio da técnica de dicroísmo circular¹⁴².

Neste trabalho, a fim de avaliar possíveis alterações na quiralidade do DNA na presença do complexo metálico **C1**, utilizou-se do dicroísmo circular (CD) ^{117; 143}. O DNA apresenta dois sinais bem distintos: em 245 nm, a banda negativa é referente à helicidade da estrutura secundária B da macromolécula, enquanto, em 275 nm, a banda positiva deve-se ao empilhamento π entre os pares de bases nitrogenadas ¹⁴³⁻¹⁴⁵. Agentes alquilantes e intercaladores tendem a potencializar ambos os sinais observados no espectro de CD do DNA, assim como pode ser observado pelos agentes intercalantes azul de metileno e brometo de etídio ^{117; 145-148}. Em contrapartida, moléculas que interagem fracamente com a biomacromolécula, tal como via interação eletrostática e/ou por meio dos sulcos, não alteram significativamente sua estrutura secundária e, portanto, o espectro de CD não é fortemente modificado ¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

Na Figura 33, encontra-se o espectro de CD para o DNA na ausência e na presença de **C1** (0-19,6 μM), o que equivale a uma relação $[\text{C1}]/[\text{DNA}]$ de até 0,4.

Figura 33 - Dicroísmo Circular do DNA com relação de $[\text{C1}]/[\text{DNA}]$ variando entre 0 a 0,4.



Fonte: Autor.

Quando a concentração de **C1** varia de 0 a 0,2 em relação à concentração de DNA no sistema, não é observada alteração significativa em ambas as bandas positiva e negativa da biomacromolécula. Contudo, quando em razões de 0,3 e 0,4, percebe-

se ligeiro aumento na intensidade ($\approx 35\%$) da banda positiva localizada em 275 nm. Logo, mesmo que não de forma expressiva, **C1** pode aumentar a interação de empilhamento π do DNA sem provocar transições da forma B para A ou Z.

Dessa forma, sugere-se que a interação existente entre o complexo metálico **C1** e DNA seja de natureza fraca.

Silva *et al.*⁶² sugeriu que o composto análogo a **C1** possa apresentar a mitocôndria como alvo biológico intracelular, em especial, por meio da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), cuja inibição pode resultar na apoptose. A fim de determinar quais interações e alvos biológicos são fundamentais para a potencial atividade antiproliferativa do complexo inédito **C1**, são necessárias análises, tais como avaliação do potencial de membrana mitocondrial, indução de formação de EROs, e estudo das possíveis interações com a enzima TrxR.

4 CONCLUSÃO

A hipótese deste trabalho foi fundamentada nas espécies reportados por Silva *et al.*⁸¹, em especial o de fórmula $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L})]\text{NO}_3$, sendo L = 2-formilpiridina-*N*(4)-etil-tiossemicarbazona. Tal composto apresentou IC_{50} de $2,27 \pm 0,16 \mu\text{M}$; $11,07 \pm 0,35 \mu\text{M}$; e $3,87 \pm 0,33 \mu\text{M}$ para as linhagens tumorais humanas A549, MCF-7 e MDA-MB-231 respectivamente. Ao comparar com o composto inédito **C1** de fórmula molecular $[\text{Ag}(\text{cTSC})(\text{phen})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, na qual cTSC = *N*(4)-etil-cinamaldeído tiossemicarbazona, percebeu-se que a modificação estrutural do fragmento tiossemicarbazona resultou de fato na alteração da atividade biológica do composto inorgânico. Para **C1**, obteve-se os valores de IC_{50} equivalentes a $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (A2780cis); $5,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (A549); e $2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (MCF-7). **C1** se mostrou promissor frente a todas as linhagens tumorais de estudo, uma vez que $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$. Ademais, ao comparar a atividade antiproliferativa determinada para ambos os compostos, sugere-se que o fragmento tiossemicarbazona seja potencialmente o grupo farmacofórico dos complexos metálicos.

Ressalta-se também que o ligante tiossemicarbazona cinamaldeído **cTSC** se mostrou biologicamente inativo, enquanto nas mesmas condições, o complexo metálico apresenta citotoxicidade promissora frente às linhagens tumorais A2780cis, A549 e MCF-7. Dessa forma, o arcaço molecular da espécie inorgânica possibilitou interações no organismo inacessíveis a **cTSC**.

Por fim, sugere-se que o mecanismo de ação de **C1** seja divergente e consiga superar a resistência celular do apresentado pela cisplatina. Tal proposta baseia-se na promissora atividade antiproliferativa frente à linhagem celular humana A2780cis do complexo de Ag(I).

REFERÊNCIAS

- ¹ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 01 Abr. 2022.
- ² ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Câncer**. 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 01 Abr. 2022.
- ³ SECRETARIA DA SAÚDE DO GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Câncer**. Disponível em: <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Cancer>>. Acesso em: 01 Abr. 2022.
- ⁴ AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2022**. 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/2022-cancer-facts-and-figures.pdf>>. Acesso em: 04 Abr 2022.
- ⁵ NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What Is Cancer?** 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#how-cancer-develops>>. Acesso em: 06 Abr. 2022.
- ⁶ FUNDAÇÃO DO CÂNCER. **Estatística de novos casos no Brasil, 2020**. 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/estatisticas/>>. Acesso em: 01 Abr. 2022.
- ⁷ AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer?** 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/what-is-cancer.html>>. Acesso em: 01 Abr. 2022.
- ⁸ INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Como surge o câncer?** 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>>. Acesso em: 01 Abr. 2022.
- ⁹ SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 1, p. 7-33, 2022.
- ¹⁰ INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. 2020. Disponível em: <[https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_c](https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=Para%20o%20Brasil%2C%20a%20estimativa,c%C3%A2nc%20de%20pele%20n%C3%A3o%20melanoma).>.>. Acesso em: 04 Abr. 2022.¹¹ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer Today. 2020. Disponível em: <

ancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0>. Acesso em: 04 Abr. 2022.

¹² SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

¹³ 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.

¹⁴ NATIONAL CANCER INSTITUTE – CANCER TRENDS PROGRESS REPORT. **Financial Burden of Cancer Care**. 2021. Disponível em: <https://progressreport.cancer.gov/after/economic_burden>. Acesso em: 05 Abr. 2022.

¹⁵ AMERICAN CANCER SOCIETY. **Why People with Cancer Are More Likely to Get Infections**. 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/low-blood-counts/infections/why-people-with-cancer-are-at-risk.html>>. Acesso em: 06 Abr. 2022.

¹⁶ AMERICAN CANCER SOCIETY. **Common Questions About the COVID-19 Outbreak**. 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.org/latest-news/common-questions-about-the-new-coronavirus-outbreak.html>>. Acesso em: 06 Abr. 2022.

¹⁷ NATIONAL CANCER INSTITUTE. **COVID-19: What People with Cancer Should Know**. 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/coronavirus/coronavirus-cancer-patient-information>>. Acesso em: 06 Abr. 2022.

¹⁸ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 06 Abr. 2022.

¹⁹ KHOURY, A.; DEO, K. M.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 207, p. 111070, 2020.

²⁰ GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, 2019.

²¹ AHMAD, S. Kinetic aspects of platinum anticancer agents. **Polyhedron**, v. 138, p. 109-124, 2017.

²² OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.

- ²³ YU, C. *et al.* Platinum-Based Combination Therapy: Molecular Rationale, Current Clinical Uses, and Future Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 13397-13412, 2020.
- ²⁴ NATIONAL CANCER INSTITUTE. **The "Accidental" Cure - Platinum-based Treatment for Cancer: The Discovery of Cisplatin.** 2014. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/research/progress/discovery/cisplatin>>. Acesso em: 06 Abr. 2022.
- ²⁵ ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.
- ²⁶ ROTTENBERG, S.; DISLER, C.; PEREGO, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 1, p. 37-50, 2021.
- ²⁷ ANTHONY, E. J. *et al.* Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. **Chemical Science**, v. 11, 12888-12917, 2020.
- ²⁸ MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 53, n. 2, p. 148-158, 2019.
- ²⁹ FANELLI, M. *et al.* New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 310, p. 41-79, 2016.
- ³⁰ TCHOUNWOU, P. B. *et al.* Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. **Journal of experimental pharmacology**, v. 13, p. 303-328, 2021.
- ³¹ PAGES, B. J. *et al.* Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 8, p. 3505-3526, 2015.
- ³² NICHOL, R. J. O. *et al.* Selective in vitro anti-cancer activity of non-alkylating minor groove binders. **MedChemComm**, v. 10, n. 9, p. 1620-1634, 2019.
- ³³ GAO, L. *et al.* The improved antitumor efficacy of continuous intratumoral chemotherapy with cisplatin-loaded implants for the treatment of sarcoma 180 tumor-bearing mice. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 208-215, 2019.
- ³⁴ NASKAR, R. *et al.* Palladium(II) complexes with thioether based ONS donor ligand: Synthesis, characterization, X-ray structure, DFT study and anti-cancer activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 534, p. 120802, 2022.
- ³⁵ EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Tookad.** 2021. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tookad>>. Acesso em: 07 Abr. 2022.

- ³⁶ RODGERS, G. E. **Química inorgânica descritiva, de coordenação e de estado sólido**. 3ª ed. São Paulo: 2018.
- ³⁷ FARIAS, R. D. **Química de coordenação: fundamentos e atualidades**. ed. Átomo, Campinas–SP, p. 151-152, 2005.
- ³⁸ MIESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química Inorgânica**. 5ª ed. São Paulo: Pearson, 2014.
- ³⁹ LI, Y. *et al.* Synthesis, characterization and ROS-mediated antitumor effects of palladium(II) complexes of curcuminoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 662-671, 2018.
- ⁴⁰ HORMANN, J. *et al.* Multiply Intercalator-Substituted Cu(II) Cyclen Complexes as DNA Condensers and DNA/RNA Synthesis Inhibitors. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 5004-5012, 2018.
- ⁴¹ ROCHA, F. V. *et al.* Computational studies, design and synthesis of Pd(II)-based complexes: Allosteric inhibitors of the Human Topoisomerase-II α . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 199, p. 110725, 2019.
- ⁴² MAHAVORASIRIKUL, W. *et al.* Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 55, 2010.
- ⁴³ 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.
- ⁴⁴ RAZAK, N. A. *et al.* Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1514, 2019.
- ⁴⁵ 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.
- ⁴⁶ MOVAHEDI, E.; REZVANI, A. R.; RAZMAZMA, H. Binding interaction of a heteroleptic silver(I) complex with DNA: A joint experimental and computational study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1244-1254, 2019.
- ⁴⁷ WELLER, M. *et al.* **Química Inorgânica**. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2017.
- ⁴⁸ LEE, J. D. **Química Inorgânica Não Tão Concisa**. 1ª ed. Blucher, 1999.
- ⁴⁹ BRESCIANI, G. *et al.* Screening the biological properties of transition metal carbamates reveals gold(I) and silver(I) complexes as potent cytotoxic and antimicrobial agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 227, p. 111667, 2022.

- ⁵⁰ MEDICI, S. *et al.* Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327-328, p. 349-359, 2016.
- ⁵¹ MARLOYE, M. *et al.* A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 18, p. 2263-2286, 2016.
- ⁵² LIANG, X. *et al.* Recent advances in the medical use of silver complex. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 62-80, 2018.
- ⁵³ KARATAŞ, M. O. *et al.* Water-soluble silver(i) complexes with N-donor benzimidazole ligands containing an imidazolium core: stability and preliminary biological studies. **Dalton Transactions**, v. 50, n. 33, p. 11596-11603, 2021.
- ⁵⁴ ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI, S. *et al.* Novel N-heterocyclic carbene silver(I) complexes: Synthesis, structural characterization, and anticancer activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 486, p. 711-718, 2019.
- ⁵⁵ PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. **Journal of Chemical Education**, v. 45, n. 9, p. 581, 1968.
- ⁵⁶ VARNA, D. *et al.* Biocompatible silver(I) complexes with heterocyclic thioamide ligands for selective killing of cancer cells and high antimicrobial activity – A combined in vitro and in silico study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 228, p. 111695, 2022.
- ⁵⁷ ALMEIDA, V. Y. G. *et al.* Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Silver Complexes Bearing Semicarbazones and Triphenylphosphine. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 46, p. 14559-14563, 2020.
- ⁵⁸ THATI, B. *et al.* Role of cell cycle events and apoptosis in mediating the anti-cancer activity of a silver(I) complex of 4-hydroxy-3-nitro-coumarin-bis(phenanthroline) in human malignant cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, n. 2, p. 203-214, 2009.
- ⁵⁹ VIGANOR, L. *et al.* The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Antibiotic Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1280-1302, 2017.
- ⁶⁰ FEIZI-DEHNAYEBI, M.; DEHGHANIAN, E.; MANSOURI-TORSHIZI, H. A novel palladium(II) antitumor agent: Synthesis, characterization, DFT perspective, CT-DNA and BSA interaction studies via in-vitro and in-silico approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 249, p. 119215, 2021.
- ⁶¹ ĐURIĆ, S. Ž. *et al.* Silver(I) complexes with 1,10-phenanthroline-based ligands: The influence of epoxide function on the complex structure and biological activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 502, p. 119357, 2020.

- ⁶² SILVA, D. E. S. Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer de mama triplo negativo. 2020. Tese (Doutorado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- ⁶³ 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.
- ⁶⁴ GAMBINO, H. B. A. 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.
- ⁶⁵ CIPRIANI, M. *et al.* Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2014, n. 27, p. 4677-4689, 2014.
- ⁶⁶ BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008.
- ⁶⁷ ROCHA, F. V. Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio(II) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina. 2013. Tese (Doutorado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- ⁶⁸ ZHANG, X. *et al.* Synthesis, structure, in silico ADME evaluation and in vitro antioxidant of (E)-N-(4-ethylphenyl)-2-(isomeric methylbenzylidene)thiosemicarbazone derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1199, p. 126972, 2020.
- ⁶⁹ GONÇALVES, A. C. R. *et al.* PtII, PdII and AuIII complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 615-631, 2017.
- ⁷⁰ DA SILVA, A. A. *et al.* Synthesis, characterization and antichagasic evaluation of thiosemicarbazones prepared from chalcones and dibenzalacetones. **Journal of Molecular Structure**, v. 1232, p. 130014, 2021.
- ⁷¹ LOBANA, T. S. *et al.* Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals - An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 7, p. 977-1055, 2009.
- ⁷² BHUSHAN SHAKYA; PARAS NATH, Y. Thiosemicarbazones as Potent Anticancer Agents and their Modes of Action. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 638-661, 2020.

⁷³ KHAN, A. *et al.* Copper(i) and silver(i) complexes of anthraldehyde thiosemicarbazone: synthesis, structure elucidation, in vitro anti-tuberculosis/cytotoxic activity and interactions with DNA/HSA. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 47, p. 17350-17367, 2020.

⁷⁴ DE SIQUEIRA, L. R. P. *et al.* Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 170, p. 237-260, 2019.

⁷⁵ TENÓRIO, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

⁷⁶ BISWAS, C. *et al.* Synthesis, structural characterization and selective anticancer activity of [Ag(L)(PPh₃)₂(NO₃)₂] [L = N(4)-substituted 2-acetylpyridine-N(4)-methyl-3-thiosemicarbazone]. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 136, p. 109178, 2022.

⁷⁷ MATESANZ, A. I. *et al.* Mononuclear Pd(ii) and Pt(ii) complexes with an α -N-heterocyclic thiosemicarbazone: cytotoxicity, solution behaviour and interaction versus proven models from biological media. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 1, p. 73-83, 2018.

⁷⁸ 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.

⁷⁹ LIMA, M. A. *et al.* Palladium(II) complexes bearing thiosemicarbazone and phosphines as inhibitors of DNA-Topoisomerase II enzyme: Synthesis, characterizations and biological studies. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 112, p. 107708, 2020.

⁸⁰ ABDUL HALIM, S. N. 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.

⁸¹ SILVA, D. E. S. *et al.* Cytotoxic and apoptotic effects of ternary silver(i) complexes bearing 2-formylpyridine thiosemicarbazones and 1,10-phenanthroline. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 16, p. 5264-5275, 2020.

⁸² LAZZARINI, A. B. Novos complexos de paládio(II) contendo tiossemicarbazonas: citotoxicidade, estudos de interação com proteínas e avaliação do potencial antitumoral. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

⁸³ KOSTRZEWA, T. *et al.* Curcumin and Cinnamaldehyde as PTP1B Inhibitors With Antidiabetic and Anticancer Potential. **Anticancer Research**, v. 39, n. 2, p. 745, 2019.

- ⁸⁴ NYAWADE, E. A. *et al.* Synthesis, characterization and anticancer activity of new 2-acetyl-5-methyl thiophene and cinnamaldehyde thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 515, p. 120036, 2021.
- ⁸⁵ KA, H. *et al.* Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Cancer Letters**, v. 196, n. 2, p. 143-152, 2003.
- ⁸⁶ AL-HROUT, A. A. *et al.* Safranal induces DNA double-strand breakage and ER-stress-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16951, 2018.
- ⁸⁷ BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4^a ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.
- ⁸⁸ DÍAZ-TORRES, R.; ALVAREZ, S. Coordinating ability of anions and solvents towards transition metals and lanthanides. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 40, p. 10742-10750, 2011.
- ⁸⁹ PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 2^a ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- ⁹⁰ TAN, M. Y. *et al.* Crystal structure of 3-ethyl-1-[(E)-[(2E)-3-phenylprop-2-en-1-ylidene]amino]thiourea, C₁₂H₁₅N₃S. **Zeitschrift für Kristallographie - New Crystal Structures**, v. 235, n. 6, p. 1439-1441, 2020.
- ⁹¹ FARIAS, R. L. D. Compostos de paládio (II) contendo tiossemicarbazonas: síntese, interação com alvos enzimáticos e avaliação do potencial antitumoral. 2020. Tese (Doutorado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- ⁹² NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, part B**. 5th ed. New York, NY: John Wiley & Sons.
- ⁹³ AHMAD, S. *et al.* Versatile coordination chemistry of mixed ligand silver(I) complexes of phosphanes and thioamides: Structural features and biological properties. **Polyhedron**, v. 214, p. 115643, 2022.
- ⁹⁴ ALMEIDA FURQUIM DE CAMARGO, B. *et al.* New Silver(I) Coordination Compound Loaded into Polymeric Nanoparticles as a Strategy to Improve In Vitro Anti-Helicobacter pylori Activity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 7, p. 2287-2298, 2020.
- ⁹⁵ BOWMAKER, G. A.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. Structural and Infrared Spectroscopic Studies of Some Novel Mechanochemically Accessed Adducts of Silver(I) Oxoanion Salts with Thiourea. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 3185-3197, 2009.

- ⁹⁶ VELHO, R. G. Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. 2006. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- ⁹⁷ TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica: Princípios e Aplicações**. 2ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005.
- ⁹⁸ ROBERT, M. S.; FRANCIS, X. W.; DAVID, J. K. **Spectrometric identification of organic compounds**. 8th revised ed. John Wiley & Sons, 2005.
- ⁹⁹ SCIENTIFIC INSTRUMENT SERVICES (SIS) BY ADAPTAS SOLUTIONS. Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter. Disponível em: <<https://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>>. Acesso em: 18 Abr. 2022.
- ¹⁰⁰ Levitt, M. H. **Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2013.
- ¹⁰¹ GÜNTHER, H. **NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts and applications in chemistry**. 3rd ed. Wiley-VCH, 2013.
- ¹⁰² TINOCO JR., I. *et al.* **Physical Chemistry: Principles and applications in biological sciences**. 5th ed. Prentice Hall, 2013.
- ¹⁰³ FARIAS, R. L. *et al.* *In vitro* and *in silico* assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on Ni(II) bearing k^2N,S -donor ligands. **Materials Science and Engineering: C**, v. 121, p. 111815, 2021.
- ¹⁰⁴ FÖRSTER, H. UV/vis spectroscopy. **Characterization I**, p. 337-426, 2004.
- ¹⁰⁵ MERCK. **MTT Assay Protocol for cell viability and proliferation**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>>. Acesso em: 19 Mar. 2022.
- ¹⁰⁶ MEERLOO, J. V.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Cancer cell culture**: Springer, p.237-245, 2011.
- ¹⁰⁷ RAI, Y. *et al.* Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1531, 2018.
- ¹⁰⁸ STOCKERT, J. C. *et al.* Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159-167, 2018.
- ¹⁰⁹ LOZANO-PÉREZ, A. A. *et al.* Antitumor properties of platinum(IV) prodrug-loaded silk fibroin nanoparticles. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 30, p. 13513-13521, 2015.

- ¹¹⁰ JIN, S. *et al.* Monofunctional Platinum(II) Anticancer Agents. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, 2021.
- ¹¹¹ SZYMAŃSKA, M. *et al.* Synthesis and Spectroscopic Investigations of Schiff Base Ligand and Its Bimetallic Ag(I) Complex as DNA and BSA Binders. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, 2021.
- ¹¹² VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- ¹¹³ MORAN, L. A. *et al.* **Bioquímica**. 5^a ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013.
- ¹¹⁴ ZHANG, Y. *et al.* Dynamic DNA Structures. **Small**, v. 15, n. 26, p. 1900228, 2019.
- ¹¹⁵ NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **Deoxyribonucleic Acid (DNA) Fact Sheet**. Disponível em: <<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Deoxyribonucleic-Acid-Fact-Sheet#:~:text=DNA%20contains%20the%20instructions%20needed,the%20work%20in%20our%20bodies.>>>. Acesso em: 31 Mar. 2022.
- ¹¹⁶ POGGI, L.; RICHARD, G.-F. Alternative DNA Structures In Vivo: Molecular Evidence and Remaining Questions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 1, p. e00110-20, 2020.
- ¹¹⁷ 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.
- ¹¹⁸ SEREC, K. *et al.* Conformational Transitions of Double-Stranded DNA in Thin Films. **Applied Sciences**, v. 11, n. 5, 2021.
- ¹¹⁹ ZACHARIAS, W. *et al.* Conditions which cause the right-handed to left-handed DNA conformational transitions. Evidence for several types of left-handed DNA structures in solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 6, p. 2775-2782, 1982.
- ¹²⁰ PASTON, S. V. *et al.* A Study of the DNA Structure in Films Using FTIR Spectroscopy. **Biophysics**, v. 65, n. 6, p. 900-906, 2020.
- ¹²¹ SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, p. 1-19, 2013.
- ¹²² LEE, A.-R. *et al.* Thermodynamic Model for B-Z Transition of DNA Induced by Z-DNA Binding Proteins. **Molecules**, v. 23, n. 11, 2018.
- ¹²³ NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

- ¹²⁴ REHMAN, S. U. *et al.* Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49-60, 2015.
- ¹²⁵ INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?** 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 10 Jan. 2022.
- ¹²⁶ ERXLEBEN, A. Interactions of copper complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 92-121, 2018.
- ¹²⁷ BARRA, C. V.; NETTO, A. V. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015.
- ¹²⁸ HAJIBABAEI, F. *et al.* DNA binding and molecular docking studies of a new Cu(II) complex of isoxsuprine drug. **Polyhedron**, v. 162, p. 232-239, 2019.
- ¹²⁹ ABDEL-RAHMAN, L. H. *et al.* Some new Ag(I), VO(II) and Pd(II) chelates incorporating tridentate imine ligand: Design, synthesis, structure elucidation, density functional theory calculations for DNA interaction, antimicrobial and anticancer activities and molecular docking studies. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 4, p. e4699, 2019.
- ¹³⁰ BEEBE, S. J. *et al.* Synthesis, characterization, DNA binding, topoisomerase inhibition, and apoptosis induction studies of a novel cobalt(III) complex with a thiosemicarbazone ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, p. 110907, 2020.
- ¹³¹ AMIRBEKYAN, K. *et al.* Design, Synthesis, and Binding Affinity Evaluation of Hoechst 33258 Derivatives for the Development of Sequence-Specific DNA-Based Asymmetric Catalysts. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 5, p. 3096-3105, 2016.
- ¹³² PEBERDY, J. C. *et al.* Influence of surface shape on DNA binding of bimetallo helicates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 11, p. 1937-1945, 2007.
- ¹³³ TENG, M. K. *et al.* The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG). **Nucleic acids research**, v. 16, n. 6, p. 2671-2690, 1988.
- ¹³⁴ CHEN, A. Y. *et al.* DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 8131, 1993.
- ¹³⁵ NAGARAJU, B. *et al.* Synthesis and biological evaluation of pyrazole linked benzothiazole- β -naphthol derivatives as topoisomerase I inhibitors with DNA binding ability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 708-720, 2019.
- ¹³⁶ BEERMAN, T. A. *et al.* Effects of analogs of the DNA minor groove binder Hoechst 33258 on topoisomerase II and I mediated activities. **Biochimica et**

Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, v. 1131, n. 1, p. 53-61, 1992.

¹³⁷ DE MOURA, T. R. *et al.* Palladium(ii) complexes bearing 1-iminothiolate-3,5-dimethylpyrazoles: synthesis, cytotoxicity, DNA binding and enzymatic inhibition studies. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 45, p. 19891-19901, 2020.

¹³⁸ VELASQUES, J. M. *et al.* Orthopalladated tetralone oxime compounds bearing tertiary phosphines: Synthesis, structure, biological and in silico studies. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 958, p. 122184, 2022.

¹³⁹ SUN, C. *et al.* Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline. **Dyes and Pigments**, v. 149, p. 867-875, 2018.

¹⁴⁰ SUSS, O.; MOTIEI, L.; MARGULIES, D. Broad Applications of Thiazole Orange in Fluorescent Sensing of Biomolecules and Ions. **Molecules**, v. 26, n. 9, 2021.

¹⁴¹ ZHANG, L. *et al.* Thiazole Orange Styryl Derivatives as Fluorescent Probes for G-Quadruplex DNA. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 5, p. 2643-2650, 2020.

¹⁴² WALLACE, B. A.; JANES, R. W. **Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy**. Netherlands: IOS press, 2009.

¹⁴³ SAKTHI, M.; RAMU, A. Synthesis, structure, DNA/BSA binding and antibacterial studies of NNO tridentate Schiff base metal complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1149, p. 727-735, 2017.

¹⁴⁴ COLINA-VEGAS, L. *et al.* Half sandwich Ru(ii)-acylthiourea complexes: DNA/HSA-binding, anti-migration and cell death in a human breast tumor cell line. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 38, p. 12865-12875, 2017.

¹⁴⁵ SEDIGHIPOOR, M. *et al.* Synthesis and characterization of new unsymmetrical Schiff base Zn (II) and Co (II) complexes and study of their interactions with bovin serum albumin and DNA by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 198, p. 38-50, 2018.

¹⁴⁶ SHAHABADI, N.; KASHANIAN, S.; DARABI, F. DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt(II) complex containing dinitrogen Schiff base ligand: The effect of metal on the mode of binding. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4239-4245, 2010.

¹⁴⁷ ZAREI, L. *et al.* Pyrazolate as bridging ligand in stabilization of self-assemble Cu(II) Schiff base complexes: Synthesis, structural investigations, DNA/protein (BSA) binding and growth inhibitory effects on the MCF7, CT-26, MDA-MB-231 cell lines. **Inorganica Chimica Acta**, v. 509, p. 119674, 2020.

¹⁴⁸ BORDBAR, M. *et al.* Interaction study of some macrocyclic inorganic schiff base complexes with calf thymus DNA using spectroscopic and voltammetric methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, p. 128-136, 2018.

¹⁴⁹ SOUSA, L. M. *et al.* DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 511, p. 119824, 2020.

¹⁵⁰ MEENONGWA, A. *et al.* DNA-interacting and biological properties of copper(II) complexes from amidino-O-methylurea. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 664-675, 2015.