

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Síntese e caracterização de complexos de Prata (I): investigação da citotoxicidade e interação com o DNA. ”

Josias da Silveira Rocha*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

* bolsista CAPES

São Carlos - SP
2020

Silveira Rocha, Josias da

Síntese e caracterização de complexos de Prata (I):
investigação da citotoxicidade e interação com o DNA. /
Josias da Silveira Rocha -- 2020.
111f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Fillipe Vieira Rocha

Banca Examinadora: Rose Maria Carlos, Wilmer José
Villareal Peña

Bibliografia

1. Complexos de prata (I). 2. Interações com o dna. 3.
Atividades antitumorais. I. Silveira Rocha, Josias da. II.
Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Josias da Silveira Rocha, realizada em 23/06/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Wilmer Jose Villarreal Peña (UFRGS)

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“Se queres vencer o mundo inteiro, vence-te a ti mesmo.”

- Fiódor Dostoiévski.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família por sempre me apoiar em todos momentos da minha vida, fica aqui minha gratidão aos meus irmãos Samuel e Jesiel, meus pais Carlos e Luzia, em especial a minha mãe por sempre lutar para nos dar o mundo.

Ao Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha pela oportunidade e confiança de poder trabalhar em seu grupo de pesquisa, pela orientação, por sempre estar disposto a ajudar e além de tudo pelo respeito e amizade.

Aos meus amigos do grupo CCQM, George cenorinha, Mauríndio, Gabi, Waze, Dário, Amos, Catequese, aqueles que já passaram e “agregado” Ludimila, Belém e Lukita. Obrigado por todas discussões sendo elas químicas ou filosóficas, por todos “happy hour” regados a cerveja e espetinhos.

Agradeço ao doutorando João Honorato do grupo LERCI pela resolução e refinamento do monocristal em parceria com o Prof. Dr. Eduardo Enersto Castellano (IFSC-USP).

Aos colegas e professores do departamento de química da UFSCar em especial o grupo LERCI, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Agradeço ao doutorando Renan Zanetti do Instituto de Química Unesp-Araraquara, pela realização do ensaio de dicroísmo circular.

Agradeço a todos funcionários do departamento, em especial a técnica Luciana Vizotto e as secretárias do programa de Pós-graduação em química, Ariane, Cristina e Luciani.

Agradeço imensamente a minha companheira Vanessa por todos esses anos juntos, obrigado por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis, por sempre me ouvir e pela amizade! Te amo!

Por fim agradeço aos órgãos de fomento FAPESP, CNPQ, em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelos 24 meses de financiamento desse projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

Palavra	
Instituto Nacional do Câncer	INCA
Organização Mundial da Saúde	OMS
Transportadores orgânicos catiônicos e de Cobre	TCO
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Dimetilsulfóxido deuterado- d_6	DMSO- d_6
Clorofórmio deuterado- d_1	CDCl ₃ - d_1
Nitrato de Prata	AgNO ₃
11-metildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	CH ₃ -L ₁
11-clorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	Cl-L ₂
11-nitrodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	NO ₂ -L ₃
[1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina	NON-L ₄ e dpoq
Pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila	CN-L ₅ e dicqn
dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina	dppz
Tiouréia	tu
Brometo de etídio	BET
Fenantrolina	fen
Dimetilformamida	DMF
Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	RMN
Espectroscopia na região do infravermelho	IV
Espectroscopia na região do ultravioleta visível	UV-vis
Etanol	EtOH
Acetonitrila	ACN
DNA de timo de bezerro	CT-DNA
tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico	Tris-HCl

Cloreto de sódio	NaCl
Constante de ligação	K _b
Comprimento de onda	λ
Absortividade molar	ϵ
Metro	m
Nanômetro	nm
Micro molar	μM
Micro litros	μL
Litros	L
Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio	MTT
Soro fetal bovino	FBS
ácido etilenodiamino tetra-acético	EDTA
Concentração de inibição de 50 % do crescimento celular	IC ₅₀
Brometo de potássio	KBr
Ácido nítrico	HNO ₃
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄
Frequência de estiramento	ν
Deformações angulares	γ , δ e β
Número de onda	cm ⁻¹
Partes por milhão	ppm
Constante de acoplamento	J
Hertz	Hz
Angstrom	Å
Câncer de Próstata	DU-145
Carcinoma de ovário resistente a cisplatina	A2780cis
Fibroblastos humanos de pulmão	MRC-5

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Citotoxicidade dos complexos frente a linhagens celulares MCF-7 e HT-29.	13
Tabela 1.2. Atividades anticâncer para os complexos 1-20, ligantes, cisplatina e mitoxantrona.....	16
Tabela 3.1 Reagentes e Solventes e suas respectivas procedências.....	19
Tabela 4.1. Características físicas dos ligantes, fórmulas moleculares e massas molares.....	31
Tabela 4.2. Atribuições das principais bandas do infravermelho para os ligantes e complexos.	39
Tabela 4.3. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para os ligantes aromáticos derivados da fenantrolina.....	44
Tabela 4.4. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para os complexos de prata (I).....	53
Tabela 4.5. Análise elementar para os complexos de prata (I), seguidos de suas condutividades em DMF.....	55
Tabela 4.6. Ângulos e distâncias de ligações para o complexo $[Ag(CN-L_5)(tu)_2].NO_3$ (5)	57
Tabela 4.7. Principais bandas com suas absorvidades molares dos ligante e complexos na região do UV-Vis.	61
Tabela 4.8. Comparação dos complexos (4) e (5) com outros análogos na literatura utilizando a técnica de interação com o CT-DNA via UV-Vis.	71
Tabela 4.9. Valores de IC_{50} para ligantes e complexos.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Incidência e óbitos dos tipos de cânceres para o ano 2018-19.....	1
Figura 1.2. Os 10 tipos de câncer mais estimados para o triênio 2020-22 no Brasil, entre homens e mulheres, exceto câncer de pele não melanoma*.....	2
Figura 1.3. Processo de metástase de células tumorais por meio de vasos sanguíneos e linfáticos.	3
Figura 1.4. Estruturas dos complexos aprovados mundialmente como agentes quimioterápicos, seguidos de suas datas de distribuições.....	4
Figura 1.5. Esquema de entrada do fármaco cisplatina nas células formando complexos ativos hidrolisados e posteriormente realizando a ligação covalente a biomolécula de DNA.....	5
Figura 1.6. Tipos de interações possíveis com o DNA.....	6
Figura 1.7. Família de ligantes heterocíclicos que tem a capacidade de intercalarem ao DNA.....	7
Figura 1.8. Isômeros possíveis para complexos octaédricos.	9
Figura 1.9. Complexos octaédricos que passaram para testes clínicos.....	10
Figura 1.10. Complexos metalointercaladores de platina.....	11
Figura 1.11. Estrutura química dos complexos bipyridínicos com tiouréias.	11
Figura 1.12. a) Estruturas gerais para os complexos de Paládio. b) Taxa de inibição de crescimento de células tumorais.	12
Figura 1.13. Estruturas dos complexos de paládio com ligantes dppz substituídos e variados coligantes.....	13
Figura 1.14. Metalointercalador quadrático plano e um não intercalador tetraédrico.	14
Figura 1.15. Docking molecular da estrutura $[Ag(daf)(phen)]NO_3$	15
Figura 1.16. Estruturas dos complexos bimetálicos constituídos do ligante planar fenantrolina e variação no número de ligações do ligante de ponte dicarboxilato.....	15
Figura 4.1. Modo de coordenação do ligante tiouréia frente a Prata.....	33
Figura 4.2. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes CH_3-L_1 e tiouréia	34
Figura 4.3. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo 2 contendo os ligantes $Cl-L_2$ e tiouréia.....	35

Figura 4.4. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes NO ₂ -L ₃ e tiouréia.....	36
Figura 4.5. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes NON-L ₄ e tiouréia.....	37
Figura 4.6. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes CN-L ₅ e tiouréia.....	38
Figura 4.7. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (CH ₃ -L ₁). Solvente: CDCl ₃	40
Figura 4.8. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (Cl-L ₂). Solvente: CDCl ₃	41
Figura 4.9. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (NO ₂ -L ₂). Solvente: CDCl ₃	42
Figura 4.10. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (NON-L ₄). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	43
Figura 4.11. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (CN-L ₅). Solvente: CDCl ₃	44
Figura 4.12. Espectro de RMN de ¹ H para os complexos [Ag ₂ (CH ₃ -L ₁) ₂ (μ-tu) ₂] (1) e [Ag ₂ (Cl-L ₂) ₂ (μ-tu) ₂] (2). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	45
Figura 4.13. a) Complexo de prata I contendo ligantes do tipo dppz e tiouréia. b) Complexo de prata I contendo ligantes fenantrolina e dicarboxilatos.....	46
Figura 4.14. Espectro de RMN de ¹³ C para o complexo [Ag ₂ (Cl-L ₂) ₂ (μ-tu) ₂] (2). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	47
Figura 4.15. Espectro de RMN de ¹ H para o complexo [Ag ₂ (NO ₂ -L ₃) ₂ (μ-tu) ₂] (3). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	49
Figura 4.16. . Espectro de RMN de ¹ H para o complexo [Ag(NON-L ₄)(tu) ₂] (4). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	50
Figura 4.17. Espectro de RMN de ¹³ C para o complexo [Ag(NON-L ₄)(tu) ₂] (4). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	51
Figura 4.18. Espectro de RMN de ¹ H para o complexo [Ag ₂ (CN-L ₅) ₂ (μ-tu) ₂] (5). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	52
Figura 4.19. Espectro de RMN de ¹³ C para o complexo [Ag ₂ (CN-L ₅) ₂ (μ-tu) ₂] (5). Solvente: DMSO- <i>d</i> ₆	53
Figura 4.20. Estrutura de monocristal do complexo 5.	56

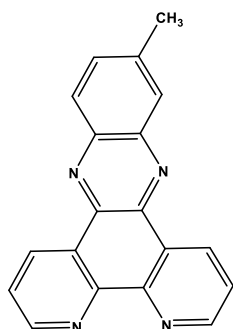
Figura 4.21. Propostas estruturais dos complexos de prata, seguidos de suas respectivas massas.....	58
Figura 4.22. Transições entre níveis energéticos possíveis em moléculas aromáticas.	59
Figura 4.23. Espectros UV-vis dos complexos sobrepostos com seus respectivos ligantes.....	60
Figura 4.24. Espectros UV-vis para o complexo (5) , sobreposto com seu respectivo ligante.....	61
Figura 4.25. Estabilidade via UV-Vis para os complexos (1) , (2) e (3) em 0, 24 e 48 horas. Solvente: DMSO.....	62
Figura 4.26. Estabilidade via UV-Vis para os complexos (4) e (5) em 0, 24 e 48 horas. Solvente: DMSO.....	63
Figura 4.27. Estabilidade em solução via RMN de ^1H para o complexo (5) . Solvente: DMSO- d_6	64
Figura 4.28. Gráfico em barras com valores de log P para os complexos.	65
Figura 4.29. Interação com o DNA via UV-Vis para os complexos (1) , (2) e (3) , respectivamente.	68
Figura 4.30. Interação com o DNA vis UV-Vis para o complexo (4) em concentrações fixas e variações crescentes da concentração de CT-DNA, regressão linear e cálculo de Kb.....	69
Figura 4.31. Interação com o DNA vis UV-Vis para o complexo (5) em concentrações fixas e variações crescentes da concentração de CT-DNA, regressão linear e cálculo de Kb.....	70
Figura 4.32. Espectro CD do CT-DNA em concentrações crescentes do complexo (3)	72
Figura 4.33. Espectro CD do CT-DNA em concentrações crescentes do complexo (4)	72
Figura 4.34. Espectro CD do CT-DNA em concentrações crescentes do complexo (5)	73
Figura 4.35. Formas do plasmídeo de DNA visto por microscopia e corrida eletroforética nas formas OC e SC.....	74
Figura 4.36. Investigação de diferentes concentrações dos complexos frente ao DNA plasmidal pBR322. Controle negativo = DNA + DMSO.	75

Figura 4.37. Investigação de diferentes concentrações da cisplatina frente ao DNA plasmidal pBR322. Controle negativo = DNA + DMSO.75

LISTA DE ESQUEMAS

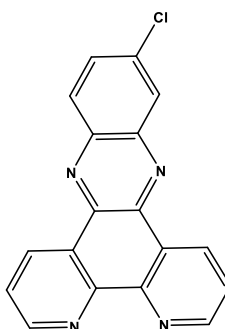
Esquema 3.1. Esquema sintético dos ligantes estendidos derivados da 1,10-fenantrolina.....	20
Esquema 3.2. Esquema sintético dos complexos em equivalência 1:1:2.....	23
Esquema 4.1. Rota sintética dos ligantes estendidos derivados da fenantrolina.	30
Esquema 4.2. Mecanismo de substituições das carbonilas do ligante fendiona pelas diaminas aromáticas.....	31

ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES



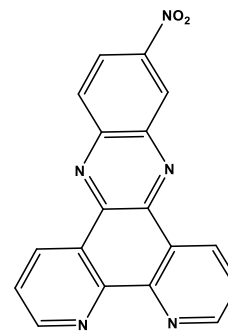
CH₃-L₁

Massa molecular: 296,11 gmol⁻¹



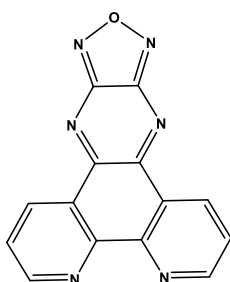
Cl-L₂

Massa molecular: 316,05 gmol⁻¹



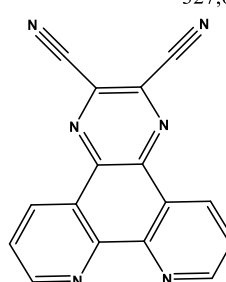
NO₂-L₃

Massa molecular:
327,08 gmol⁻¹



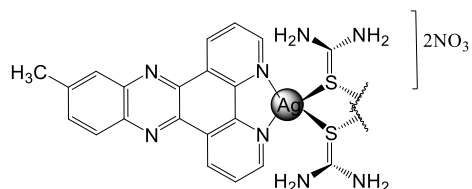
NON-L₄

Massa molecular: 274,06 gmol⁻¹



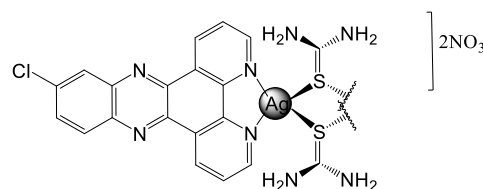
CN-L₅

Massa molecular: 282,07 gmol⁻¹



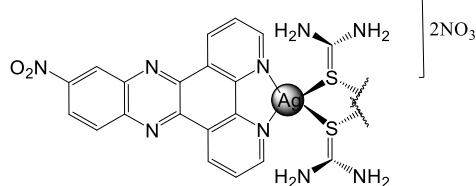
[Ag₂(CH₃-L₁)₂(μ-tu)₂].2NO₃ (1)

Massa molecular: 1082 gmol⁻¹



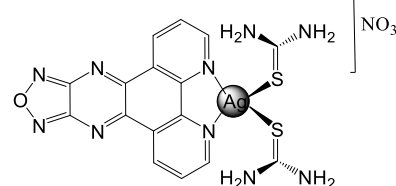
[Ag₂(Cl-L₂)₂(μ-tu)₂].2NO₃ (2)

Massa molecular: 1122 gmol⁻¹



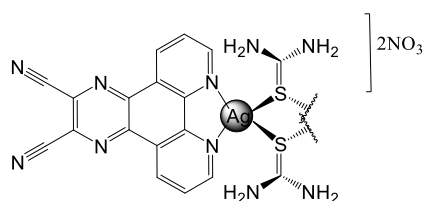
[Ag₂(NO₂-L₃)₂(μ-tu)₂].2NO₃ (3)

Massa molecular: 1144 gmol⁻¹



[Ag(NON-L₄)(tu)₂].NO₃ (4)

Massa molecular: 597 gmol⁻¹



[Ag₂(CN-L₅)₂(μ-tu)₂].2NO₃ (5)

Massa molecular: 1054 gmol⁻¹

RESUMO

“Síntese e caracterização de complexos de Prata (I): investigação da citotoxicidade e interação com o DNA.”

Apesar do sucesso no tratamento de tumores, em especial os sólidos, a cisplatina não é específica, o que acarreta efeitos colaterais severos. Além disso, alguns tipos de tumores possuem resistências ao fármaco. Diante disso, faz-se necessário a busca de novos compostos que atuem de formas diferentes. Se tratando de interações com a biomolécula de DNA, a intercalação é uma das mais promissoras, pois pode causar danos irreversíveis a sua estrutura. Face ao exposto, este trabalho teve como objetivo a síntese e a caracterização de cinco novos complexos de prata (I) do tipo $[Ag_n(R-L)_n(tu)_2](NO_3)_n$, onde $n = 1$ ou 2 , R-L= ligante estendido com substituintes CH_3 , Cl , NO_2 , CN (nitrila) e NON (furazano), $tu =$ tiouréia. As estruturas moleculares foram propostas baseando-se nas técnicas espectroscópicas na região do UV-Vis, Infravermelho, RMN de 1H e ^{13}C $\{^1H\}$, condutividade molar, análise elementar e difração de raios X de monocristal, quando obtidos. Os complexos se mostraram estáveis em ambientes como luz, ar e soluções de DMSO. Os dados obtidos pelas técnicas de RMN 1H e CHN indicaram a formação de complexos diméricos para os complexos **1-3** e **5**. Pela avaliação dos ensaios de interações com a biomolécula de DNA, somente os complexos **4** e **5** demonstraram capacidade de interagir com o DNA, com constantes de ligações (K_b) de $1,05 \times 10^5$ e $7,66 \times 10^4$, respectivamente. Todos os compostos tiveram suas citotoxicidades investigadas frente a células tumorais de próstata (DU-145) e carcinoma de ovário resistente a cisplatina (A2780cis), destacando-se entre eles os complexos $[Ag(NON-L_4)(tu)_2]NO_3$ (**4**) e $[Ag_2(CN-L_5)_2(\mu-tu)_2](NO_3)_2$ (**5**) que tiveram baixos valores de IC_{50} na faixa entre $0,403-6,36 \mu M$, superando significativamente os valores encontrados para o fármaco cisplatina. Estes resultados, demonstram que o arcabouço molecular construído é promissor para o desenvolvimento de complexos de prata (I) com elevada atividade anticâncer.

ABSTRACT

“Synthesis and characterization of Silver (I) complexes: cytotoxicity research and interaction with DNA.”

The inorganic compound, cisplatin, is used on a large scale to different types of cancer. This complex acts in DNA structure by covalent bonds. However, the chemotherapy agent presents several side effects and some tumors are resistant to the treatment with cisplatin. Thus, new researches are necessary to find more specific agents with different modes of action. Intercalation provides severe damage to DNA structure initiating the apoptosis process. Therefore, the aim of our work was the synthesis and characterization of five new silver (I) complexes of the type $[Ag_n(R-L)_n(tu)_2](NO_3)_2$, where $n = 1$ or 2 , R-L = extended ligand with substituents CH_3 , Cl, NO_2 , CN(nitrile) and NON (furazan), tu = thiourea. The molecular structures were proposed by spectroscopic analysis (UV-Vis, IR, NMR), elemental analysis, molecular conductometry, and X-ray diffraction when obtained single crystals. All compounds had their cytotoxicities investigated against prostate tumor cells (DU-145) and cisplatin-resistant ovarian carcinoma (A2780cis), standing out among them the complexes $[Ag(NON-L4)(tu)_2]NO_3$ and $[Ag_2(CN-L5)_2(\mu-tu)_2](NO_3)_2$ who had low IC_{50} values in the range at 0,403-6,36 μM being more actives than cisplatin. The structural features of these compounds are promising to develop new silver (I) complexes with high anticancer activities.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. O Câncer, estimativas e como se desenvolve.....	1
1.2. Tipos de tratamentos, cisplatina e o DNA como alvo biológico	3
1.3. Intercalação, alternativa de atuação em neoplásicas resistentes.....	6
1.4. Complexos Octaédricos, Quadráticos-planos e Tetraédricos e a busca pela intercalação.....	8
1.4.1. Complexos Octaédricos	8
1.4.2. Complexos Quadráticos-planos.....	10
1.4.3. Complexos Tetraédricos.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Solventes e reagentes.....	19
3.2. Metodologia sintética.....	19
3.2.1. Síntese dos ligantes	19
3.2.1.1. Síntese do ligante 1,10-fenantrolina-5,6-diona.....	20
3.2.1.2. Síntese do ligante 11-metildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (CH ₃ -L ₁)	21
3.2.1.3. Síntese do ligante 11-clorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (Cl-L ₂)	21
3.2.1.4. Síntese do ligante 11-nitrodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (NO ₂ -L ₃).....	22
3.2.1.5. Síntese do ligante [1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazin[2,3-f][1,10]fenantrolina (NON-L ₄)	22
3.2.1.6. Síntese do ligante pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila (CN-L ₅)	22
3.2.2. Síntese dos complexos heteroléticos de prata I	23
3.2.2.1. Síntese do complexo [Ag ₂ (CH ₃ -L ₁) ₂ (μ-tu) ₂](NO ₃) ₂ (1)	23
3.2.2.2. Síntese do complexo [Ag ₂ (Cl-L ₂) ₂ (μ-tu) ₂](NO ₃) ₂ (2)	24
3.2.2.3. Síntese do complexo [Ag ₂ (NO ₂ -L ₃) ₂ (μ-tu) ₂](NO ₃) ₂ (3)	24
3.2.2.4. Síntese do complexo [Ag(NON-L ₄)(tu) ₂]NO ₃ (4)	24
3.2.2.5. Síntese do complexo [Ag ₂ (CN-L ₅) ₂ (μ-tu) ₂](NO ₃) ₂ (5)	24

3.3. Métodos Instrumentais	25
3.3.1. Determinação do Ponto de Fusão	25
3.3.2. Análise elementar (CHN).....	25
3.3.3. Medidas de condutividade molar	25
3.3.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	25
3.3.5. Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível	26
3.3.6. Ressonância magnética nuclear (RMN)	26
3.3.7. Coeficiente de partição (P)	26
3.3.8. Difração de Raios X de monocristal	27
3.4. Ensaio Biológicos	27
3.4.1. Interações com o DNA	27
3.4.1.1. Interação com o CT-DNA via espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis).....	27
3.4.1.2. Interação com plasmídeo superenovelado	28
3.4.1.3. Dicroísmo circular (CD)	28
3.4.2. Citotoxicidade	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Aspectos físicos e químicos dos ligantes e complexos	30
4.1.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	32
4.1.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)	40
4.1.3.1. RMN ¹ H dos Ligantes	40
4.1.3.2. RMN ¹ H e ¹³ C{ ¹ H} dos complexos	45
4.1.4. Análise elementar e Condutividade molar	55
4.1.5. Descrição do cristal obtido para o complexo [Ag(CN-L ₅)(tu) ₂]NO ₃ (5)	56
4.1.6. Proposta Estrutural.....	57
4.1.7. Espectrometria eletrônica na região do UV-Visível	58
4.1.8. Estabilidade em solução dos complexos	62
4.1.9. Coeficiente de partição dos complexos	65
5. ENSAIOS BIOLÓGICOS E INTERAÇÕES COM O DNA.....	67
5.1. Interações dos complexos frente ao DNA	67

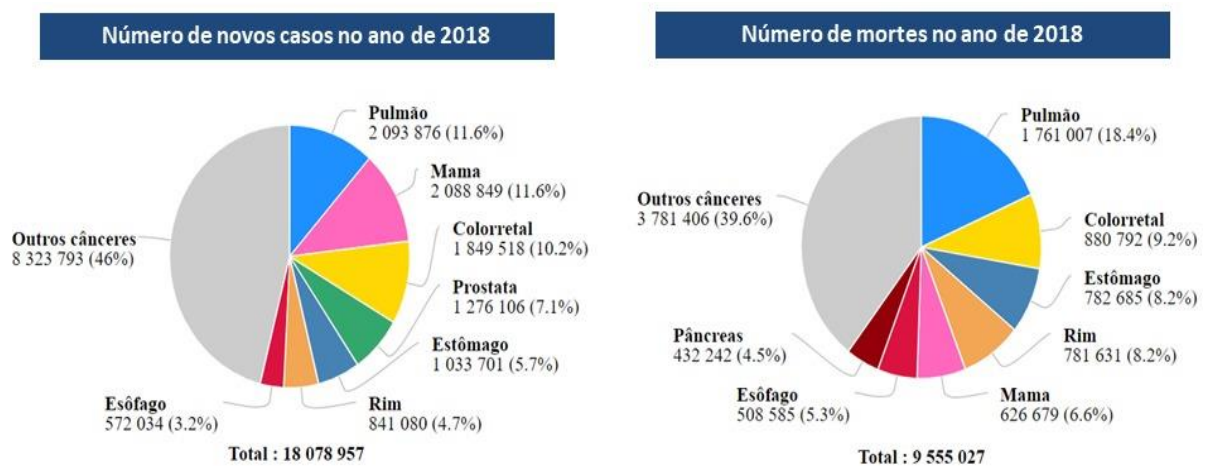
5.1.1. Determinação de Kb por espectroscopia na região do UV-Vis.....	67
5.1.2. Dicroísmo Circular (CD)	71
5.1.3. Interação com o DNA via eletroforese em gel	74
5.2. Determinação da atividade citotóxica.	76
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8. APÊNDICES	88

1.Introdução

1.1. O Câncer, estimativas e como se desenvolve

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo desenvolvimento descontrolado de células transformadas, que faz várias vítimas ao redor do mundo, sendo a segunda causa de mortes em países industrializados, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. Estatisticamente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 29,7 % de mortes por alguma doença no ano de 2016, foi devido a algum tipo de câncer. Ainda, para o biênio 2018-2019 foram estimados 18,1 milhões de novos casos, levando a morte de 9,6 milhões de pessoas. Para o mesmo ano, os cânceres mais proeminentes foram os de pulmão, mama e colo retal (Fig. 1.1)¹.

Figura 1.1. Incidência e óbitos dos tipos de cânceres para o ano 2018-19¹.



Em uma pesquisa realizada pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) juntamente com o Ministério da Saúde, estima-se que para o triênio 2020-22 irão ocorrer 625 mil novos casos de câncer no Brasil (incluindo o câncer de pele não melanoma), sendo os mais incidentes, mama e próstata (132 mil casos), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). (Fig. 1.2)².

Figura 1.2. Os 10 tipos de câncer mais estimados para o triênio 2020-22 no Brasil, entre homens e mulheres, exceto câncer de pele não melanoma*².

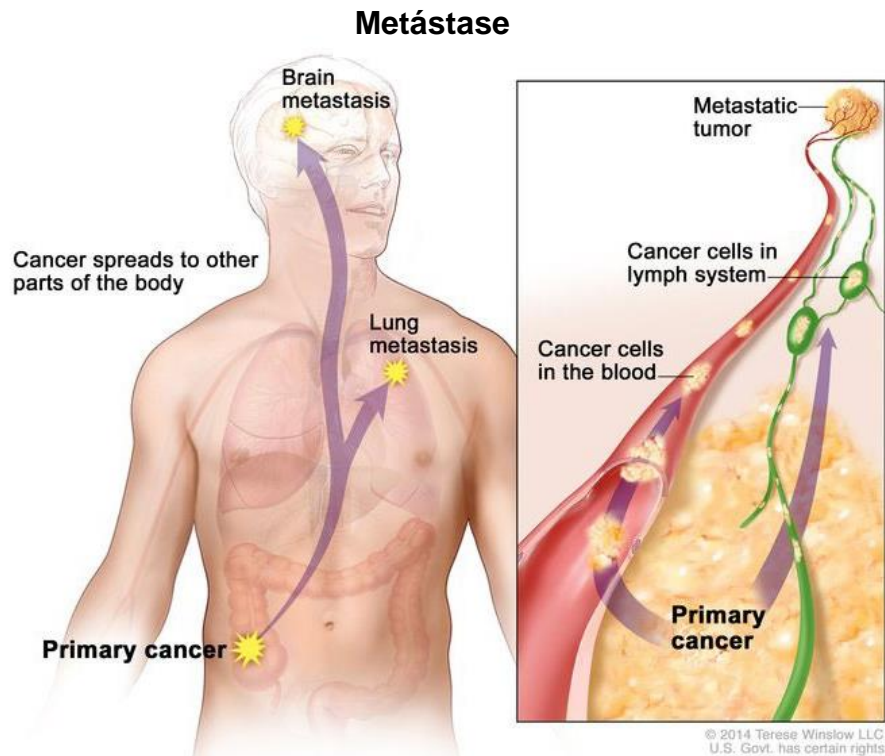
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Existem alguns fatores que potencializam o desenvolvimento de tumores, esses fatores são caracterizados como sendo hereditários que são minoria quando comparados aos cânceres esporádicos, ou seja, aqueles que se desenvolvem devido ao ambiente que o indivíduo está exposto. Esses ambientes são desde condições insalubres de trabalho e se estendem aos hábitos de vida, como alimentação não saudável, sedentarismo, uso de medicamentos e o tabagismo³.

A principal diferença entre as células saudáveis e as neoplásicas se dá pelo crescimento desordenado, como essas não tem funções específicas, o tecido ou órgão onde essas neoplasias estão se desenvolvendo perdem a função. Uma característica que torna o tratamento dessas neoplasias difíceis é a possibilidade de migração para outros tecidos vizinhos ou não dos tumores de origem, gerando novas neoplasias⁴. Essa migração é conhecida como metástase, como as células tumorais se desenvolvem descontroladamente é necessário a criação de novos vasos sanguíneos para nutri-lo, esse processo se dá pela angiogênese, e em contrapartida servem de escape para a migração celular^{3,5}. (Fig. 1.3).

Figura 1.3. Processo de metástase de células tumorais por meio de vasos sanguíneos e linfáticos⁶.



Diante do exposto até o momento, a melhor maneira de prevenir o desenvolvimento acentuado dessas células cancerosas são os diagnósticos rápidos e a busca de novos fármacos que tenham grande eficácia no combate a proliferação desses tumores.

1.2. Tipos de tratamentos, cisplatina e o DNA como alvo biológico

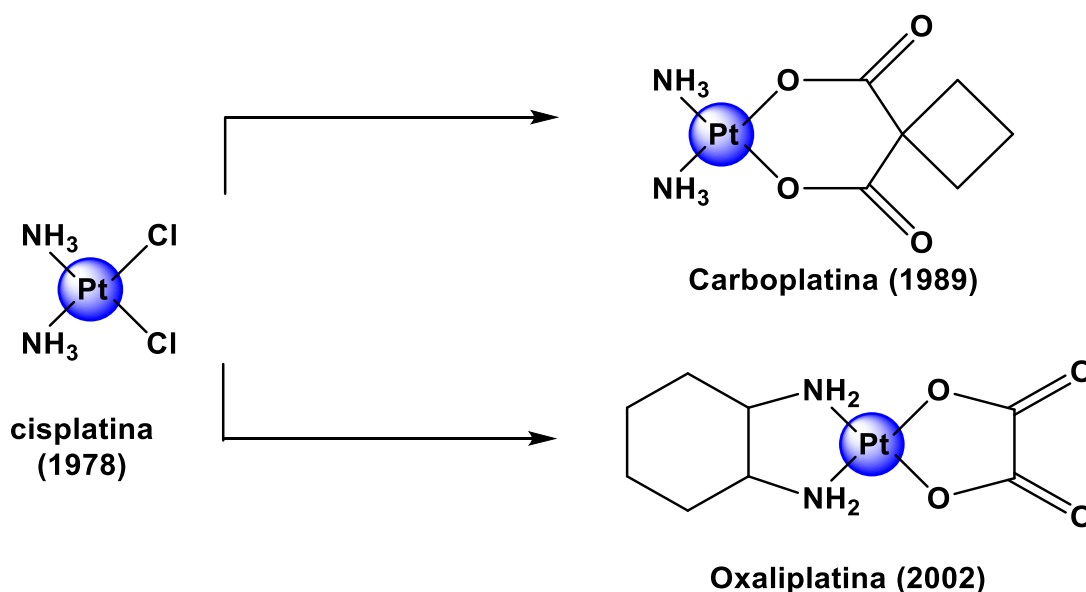
Existem vários tratamentos no combate ao câncer: cirurgia; radioterapia; imunoterapia; terapia hormonal; transplante de medula óssea; quimioterapia. Sendo os tratamentos clássicos, cirurgia, radioterapia e aplicação de fármacos com ações quimioterápicas⁷.

A cirurgia oncológica ocorre a fim de remover completamente o tumor do paciente, isso quando é detectado ainda no início, para esse procedimento leva-se em conta a aplicação de quimioterápicos como uma forma de evitar a metástase ou crescimento da neoplasia. A radioterapia também está conectada com a cirurgia, esse

tratamento é utilizado como um inibidor do crescimento do câncer, aplicando-se radiações ionizantes, em alguns casos, o tratamento radioterápico leva ao desaparecimento do tumor^{7,8}.

A quimioterapia consiste na aplicação de fármacos (quimioterápicos). Os meios mais comuns de se administrar os compostos são por via oral, intravenosa e intramuscular. Um dos quimioterápicos mais importantes é o complexo *cis*-diaminodichloridoplatina (II), comumente conhecido como cisplatina. Suas atividades antitumorais foram descobertas na década de 60, desde então o interesse pelos complexos metálicos na busca de novos fármacos se intensificou. Além da cisplatina que tem sua aprovação no tratamento de vários tipos de câncer, pode-se destacar outros dois complexos de platina, que também são aprovados para tratamentos de diversas neoplasias em nível mundial, carboplatina e oxaliplatina⁹. (Fig. 1.4)

Figura 1.4. Estruturas dos complexos aprovados mundialmente como agentes quimioterápicos, seguidos de suas datas de distribuições.

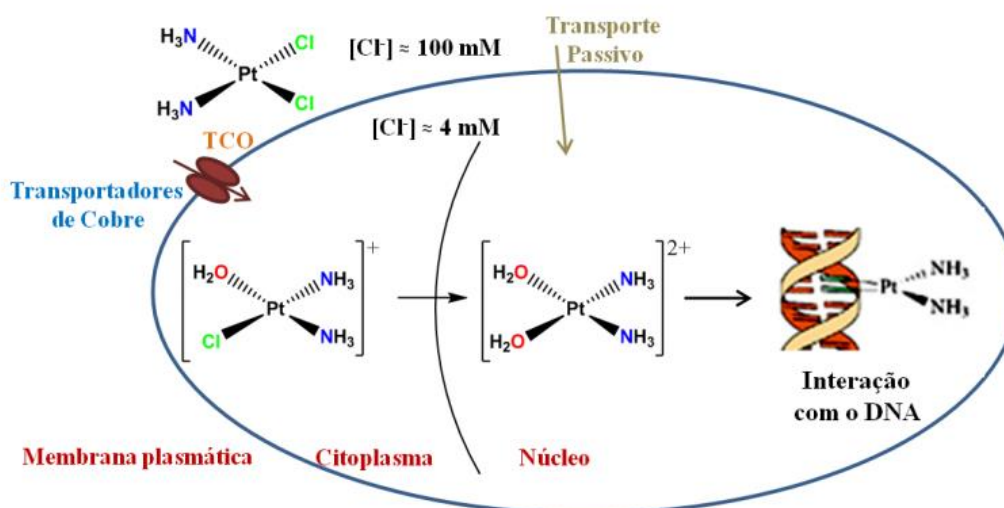


Fonte: Autor

O mecanismo de ação mais aceito para a cisplatina e seus análogos é a ligação covalente as bases nitrogenadas do DNA. No meio extracelular a cisplatina permanece com sua estrutura intacta já que o meio tem maiores concentrações de íons cloreto (cerca de 100 mM), já dentro da membrana plasmática essa concentração caí para cerca de 4 mM, onde então formam-se as espécies ativas de platina hidrolisadas, responsáveis pela formação de adutos com o DNA. A permeação do fármaco

pelas membranas se dá pela difusão passiva ou ativa, essa última ocorre por meio dos transportadores de cobre e catiônicos orgânicos (TCO)^{10,11}. (Fig. 1.5.).

Figura 1.5. Esquema de entrada do fármaco cisplatina nas células formando complexos ativos hidrolisados e posteriormente realizando a ligação covalente a biomolécula de DNA¹⁰.



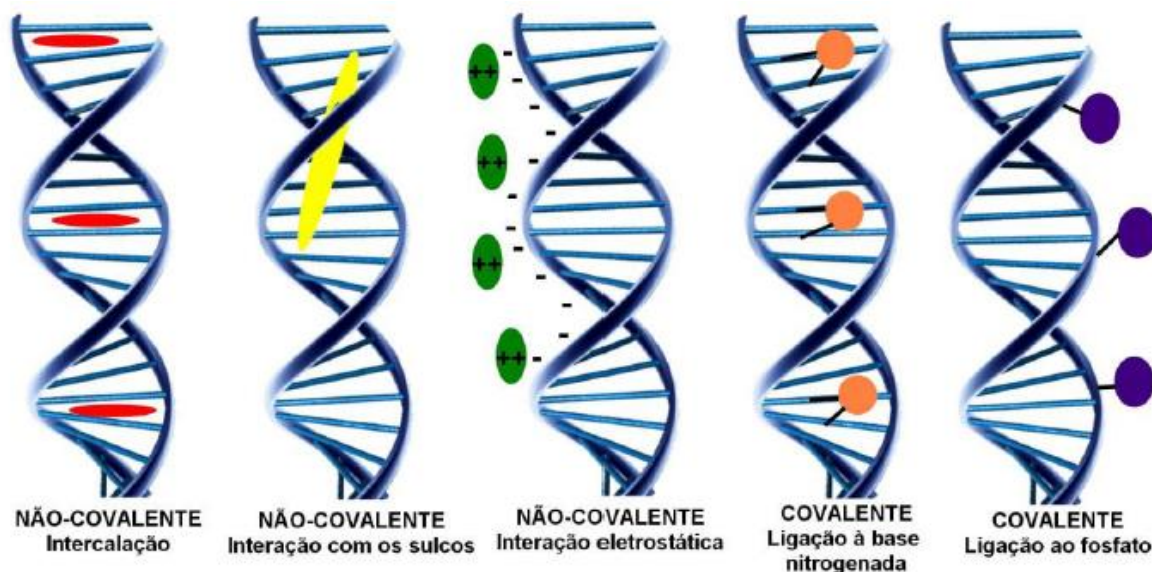
A ligação frente ao DNA se dá de maneira covalente, através da labilização das moléculas de água e inserção das bases nitrogenadas (adenina e guanina) do DNA por conferirem ligações mais favorecidas. Preferencialmente, o aduto majoritário é formado pela ligação ao nitrogênio da guanina por conta do seu menor impedimento estérico e a possibilidade de ligações de hidrogênio entre a amina do complexo com o oxigênio da base nitrogenada^{10,12}. Os efeitos causados por essas ligações são capazes de desestabilizar a estrutura do DNA em ângulos de torções que são efetivos contra a sua reparação, isso evita a replicação da célula e conseqüentemente leva a morte celular por apoptose.

Apesar da alta gama de aplicações da cisplatina frente a diversos tipos de cânceres como: próstata; testículo; ovário; pulmão, o fármaco apresenta limitações e ou restrições, caracterizadas pela resistência de alguns tipos de tumores, seja ela intrínseca ou adquirida^{10,13} e seus efeitos colaterais, dentre eles os mais comuns são a neurotoxicidade e a nefrotoxicidade. Diante disso, novas pesquisas se voltam na busca de novos fármacos capazes de suprirem tanto os efeitos colaterais quanto a resistência.

1.3. Intercalação, alternativa de atuação em células neoplásicas resistentes

Além da ligação covalente às bases nitrogenadas e aos grupos fosfatos, outros tipos de interações, estas não covalentes, são possíveis na estrutura supramolecular do DNA. (Fig 1.6.)

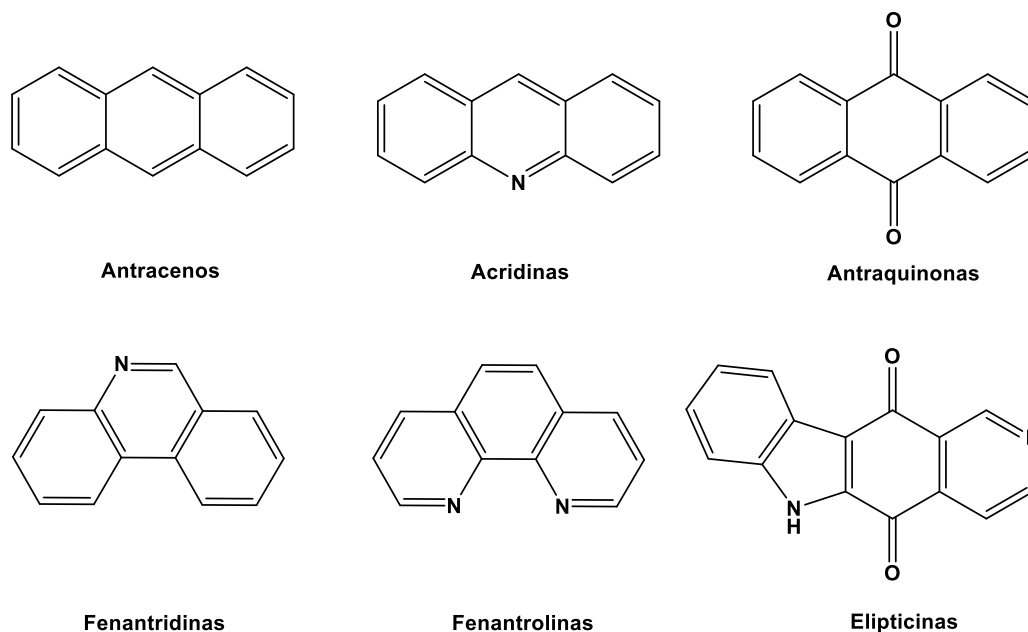
Figura 1.6. Tipos de interações possíveis com o DNA⁹.



Pode-se destacar a interação não covalente do tipo intercalativa entre as bases nitrogenadas, uma vez que este tipo de interação provoca mudanças substanciais na estrutura do DNA. Esse modo de interação foi primeiramente proposto por Lerman para explicar a forte afinidade do DNA por moléculas do tipo aromáticas heterocíclicas como os ligantes acridinas¹⁴⁻¹⁶.

Para ser considerado um possível intercalador algumas propriedades estruturais devem ser obedecidas, por exemplo, espécies altamente planares pertencentes as famílias de ligantes do tipo, antracenos, acridinas, antraquinonas, fenantridinas, fenantrolinas e elipticinas (Fig. 1.7.), mostraram ter sua bioatividade relacionada as suas estruturas planares e aromáticas¹⁷.

Figura 1.7. Família de ligantes heterocíclicos que tem a capacidade de intercalarem ao DNA¹⁷.



Adaptado de Wheate e colaboradores.

Essas moléculas ricas em elétrons π e altamente planares conseguem se intercalar entre as bases do DNA e formar adutos estáveis, essas interações são estabilizadas por conta da diminuição de energia entre as transições dos orbitais do intercalador e das bases do DNA. Como já dito, quando ocorrem essas intercalações tem-se mudanças, muitas das vezes, irreparáveis a dupla hélice. Intercaladores clássicos como o brometo de etídio e a proflavina causam mudanças no desenrolamento do DNA, distorcendo sua estrutura em cerca de 26° e 17° , respectivamente, consequentemente essas alterações evitam a transcrição, replicação e o reparo da dupla hélice, isso faz com que esses intercaladores sejam considerados potentes agentes biológicos^{16,18,19}. Atualmente, são aprovados quatro compostos com propriedades intercalativas que atuam no tratamento de neoplasias, são eles: deunorrubicina; doxorubicina; mitoxantrona; ansacrina⁹.

Diante do exposto, uma forma de potencializar a intercalação é a coordenação desses tipos de moléculas aos metais de transição, visto que a formação do complexo pode conferir uma carga positiva, levando a uma maior atração pela biomolécula devido as cargas negativas que são provenientes dos oxigênios dos grupos fosfatos²⁰.

1.4. Complexos Octaédricos, Quadráticos-planos e Tetraédricos e a busca pela intercalação.

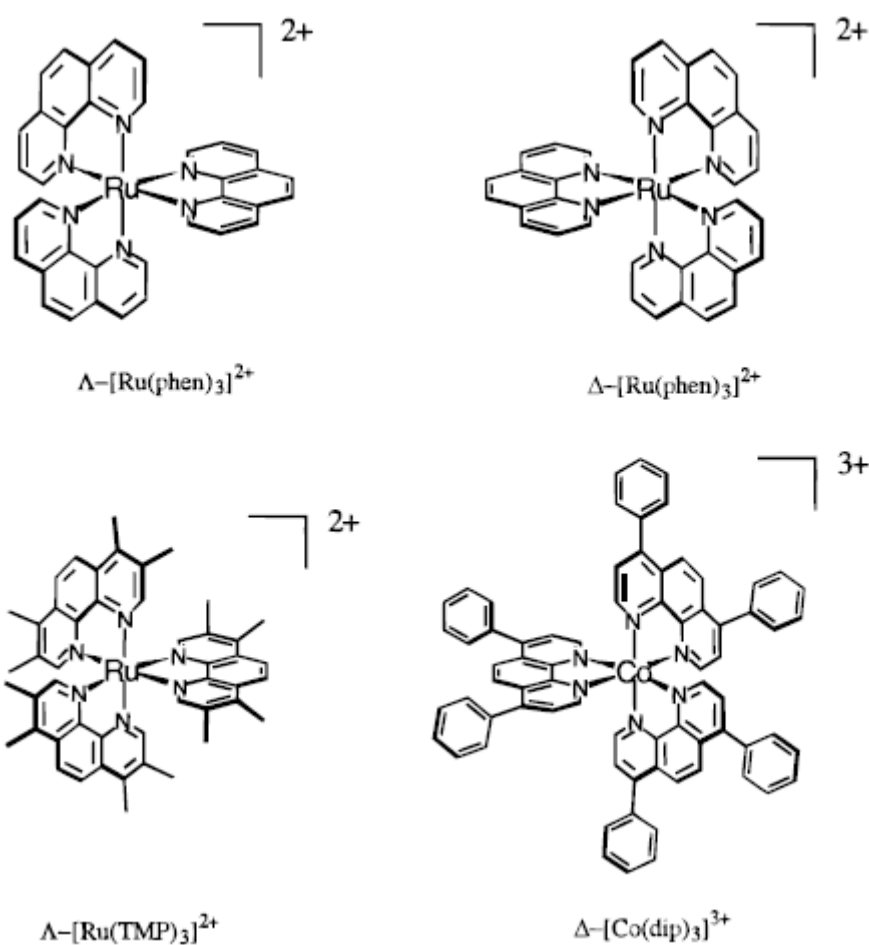
Como descrito, os complexos possuem uma grande vantagem em relação aos compostos orgânicos, além da carga positiva, podem atuar como âncoras tendo em volta de si vários tipos de ligantes auxiliares que podem operar de maneira bioativa frente ao alvo de interesse. Além disso, esses complexos podem exibir propriedades fotoquímicas e/ou eletroquímicas, que são de suma importância na ativação e no mapeamento dentro das células²⁰.

1.4.1. Complexos Octaédricos

Os complexos com essa estrutura possuem a capacidade de terem em seu arcabouço molecular até três ligantes planares bidentados, os íons metálicos mais comumente utilizados para esse fim são: Rutênio; Rênio; Ósmio; Cobalto; Níquel; Zinco²¹⁻²⁶.

Complexos octaédricos mostram primordialmente três tipos de interações: intercalativas clássicas; interações eletrostáticas; interações nos sulcos (Maior ou menor). Vários estudos mostraram que se tratando de complexos com ligantes do tipo tris(fenantrolina) a preferência na intercalação é dada pelos Δ -isômeros (dextrogiro), enquanto os Λ -isômeros (levogiro) levam a interações nos sulcos (Fig 1.8.)²⁷. Mostrando uma relação direta entre a estrutura tridimensional das espécies e a estrutura supramolecular do DNA²⁸.

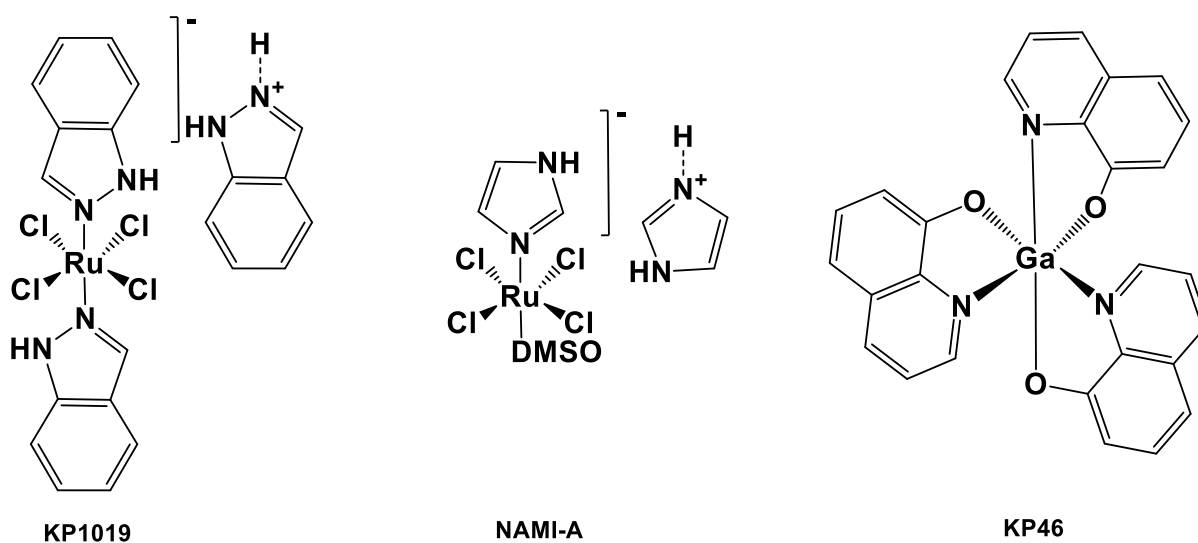
Figura 1.8. Isômeros possíveis para complexos octaédricos²⁷.



Apesar das baixas citotoxicidades em comparação a cisplatina apresentada por alguns complexos de Rutênio, esta classe de compostos demonstra ser mais tolerada pelo organismo, mantendo-se inativos em sua forma de Ru (III), em alguns casos, até atingirem o tumor, onde os baixos níveis de oxigênio favorecem a redução ao Ru (II), que é responsável pela atividade²⁹. Além disso, estes complexos também se diferenciam pela possibilidade de realizarem fortes ligações com as proteínas Transferrina e Albumina, facilitando sua biodistribuição pelo corpo²⁹.

Os complexos de Rutênio que conseguiram chegar a testes clínicos são denominados KP1019 e NAMI-A (Fig 1.9), ambos se destacaram pela estabilização da proliferação de tumores sólidos. Outro complexo que avançou para testes clínicos foi o KP46 (Fig 1.9.), apesar de o Gálio ser o centro metálico, o composto conta com uma disposição octaédrica, o composto demonstrou a estabilização de um carcinoma renal por 11 meses, tendo seu principal meio de ação a inibição da enzima Ribonucleotídeo redutase, que catalisa a formação de desoxirribonucleotídeos dos ribonucleotídeos²⁹⁻³².

Figura 1.9. Complexos octaédricos que passaram para testes clínicos²⁹.



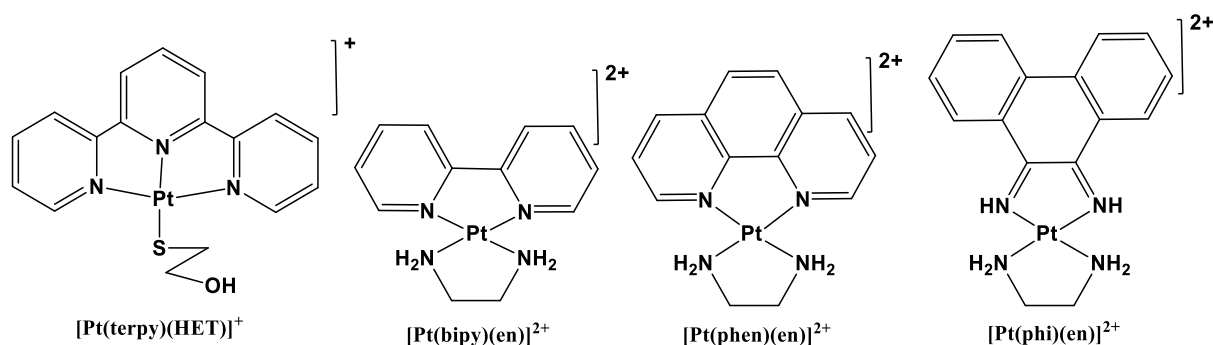
Adaptado de Alama e colaboradores.

1.4.2. Complexos Quadráticos-planos

Essa disposição estrutural é decorrente dos íons de configurações d^8 provenientes, principalmente, dos metais do grupo 10, Ni (II), Pd (II) e Pt (II). Devido à disposição planar, a atuação direta no DNA por compostos contendo estes metais se dá de maneira bem intuitiva.

Lippard e colaboradores demonstraram que complexos de platina quadráticos planos contendo ligantes heterocíclicos derivados da piridina, terpiridina, fenantrolina, bipyridina podem atuar de maneira não covalente (intercalação) entre as bases do DNA¹⁶. (Fig 1.10.).

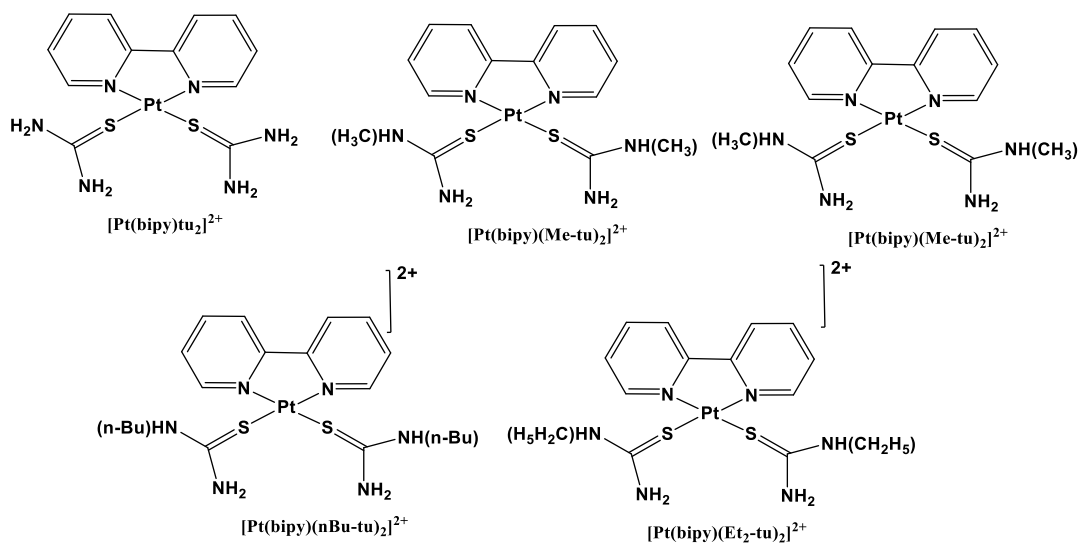
Figura 1.10. Complexos metalintercaladores de platina¹⁶.



Adaptado de Liu e colaboradores.

Seguindo a mesma linha, Maverti e colaboradores sintetizaram complexos contendo bipyridinas e coligantes tiouréias substituídas (Fig.1.11.), os compostos se mostraram solúveis em água, o que é uma característica extremamente desejável se tratando das aplicações biológicas, e variando-se os substituintes nos ligantes auxiliares, obteve-se um grande aumento nas citotoxicidades desses complexos, por exemplo, evidenciou-se um aumento de aproximadamente 100 vezes (445 para 4 μM) da atividade citotóxica quando se aumentou os substituintes dos ligantes tiouréias (de hidrogênios para grupos fenílicos) em uma célula de ovário resistente a cisplatina, mostrando assim a importância dos coligantes no planejamento estrutural³³.

Figura 1.11. Estrutura química dos complexos bipyridínicos com tiouréias³³.

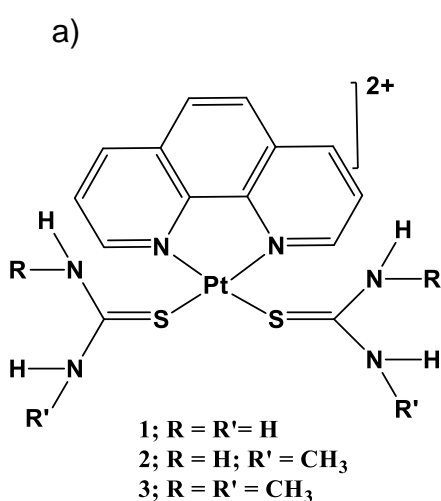


Adaptado de Maverti e colaboradores.

Depois do grande sucesso da cisplatina como o primeiro fármaco inorgânico no tratamento de várias neoplasias, foi dado um grande foco para os complexos de paládio, uma vez que possuem grande similaridade estrutural com seus análogos de platina. No entanto, uma diferença crucial entre os dois metais, está relacionada a cinética de reação. O paládio exibe uma cinética de troca de ligante aproximadamente 10^5 vezes mais rápida que a platina, podendo acarretar a inativação do complexo antes mesmo de atingir o DNA. Por isso, se faz necessário o uso de ligantes do tipo quelato, que conferem em uma maior estabilidade termodinâmica e menor cinética de reação. Em termos de atuação biológica, os complexos de paládio (II) demonstraram ter atividades anticâncer significativas, assim como baixa toxicidade em comparação ao fármaco padrão (cisplatina)^{34,35}.

Na busca de atividades citotóxicas frente a linhagens celulares resistentes a cisplatina, Barra e colaboradores sintetizaram complexos de paládio com ligantes fenantrolinas e tiouréias (Fig 1.12a). Estes compostos apresentaram interação com a molécula de DNA. Os autores demonstraram a capacidade do composto **2** em inibir 64 % o crescimento de células neoplásicas de mama resistentes a cisplatina (MCF7-R) na concentração de 10 μ M (Fig 1.12b). Adicionalmente, os complexos se mostraram capazes de intercalarem entre as bases nitrogenadas do DNA e de inibirem a ação da enzima Topoisomerase II, atuando possivelmente, estabilizando o complexo DNA-topo evitando sua replicação³⁶.

Figura 1.12. a) Estruturas gerais para os complexos de Paládio. b) Taxa de inibição de crescimento de células tumorais³⁶.

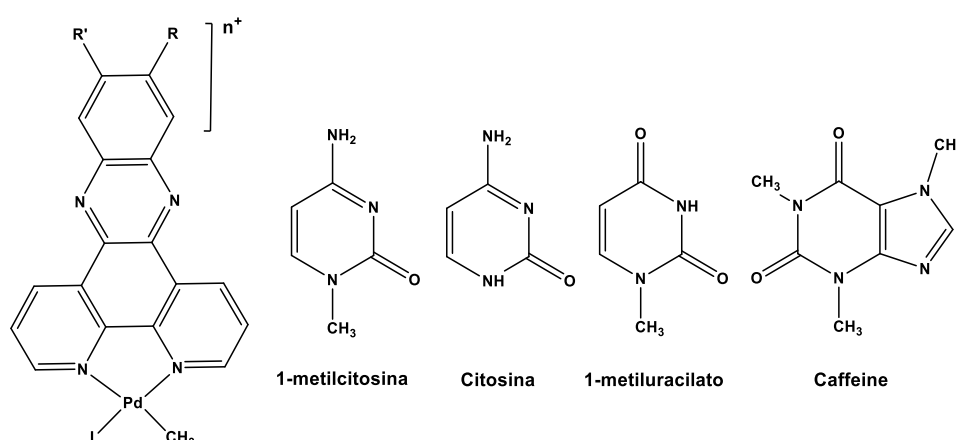


b)

Compound	KB		MCF7		MCF7-R	
	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M
[Pd(phen)(tu) ₂ Cl ₂ (1)	2 \pm 5	0 \pm 17	0 \pm 10	0 \pm 8	30 \pm 2	0 \pm 3
[Pd(phen)(mtu) ₂ Cl ₂ (2)	26 \pm 2	0 \pm 6	0 \pm 15	0 \pm 3	64 \pm 1	0 \pm 2
[Pd(phen)(dmtu) ₂ Cl ₂ (3)	23 \pm 7	0 \pm 2	0 \pm 6	0 \pm 7	59 \pm 1	0 \pm 4

Butsch e colaboradores investigaram as atividades citotóxicas de complexos organometálicos de paládio do tipo $[(RR'dppz)Pd(Me)L]^{n+}$, sendo $RR'dppz$ derivados do ligante planar estendido dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina com os substituintes R variando entre Cl, CF_3 , NO_2 , NH_2 e os coligantes $L = Cl$, 1-metiluracilato, piridina, citosina, cafeína e 1-metilcitosina (Fig. 1.13.). Alguns dos complexos foram mais ativos do que a cisplatina frente às linhagens de mama (MCF-7) e de cólon (HT-29)³⁷. (Tabela 1.1)

Figura 1.13. Estruturas dos complexos de paládio com ligantes dppz substituídos e variados coligantes³⁷.



Adaptado de Butsch e colaboradores.

Tabela 1.1. Citotoxicidade dos complexos frente a linhagens celulares MCF-7 e HT-29³⁷.

Composto	IC ₅₀ HT-29/ μM^a	IC ₅₀ MCF-7/ μM^b
Cisplatina	7.0±2.0	2.0±0.3
[(dppz)Pd(Me)Cl]	>100	>100
[(dppz)Pd(Me)(1MeUra)]	3.7±1.3	1.9±0.2
[(dcddppz)Pd(Me)Cl]	2.2±0.4	2.8±1.6
Dcdppz	>100	>100
[(tfmdppz)Pd(Me)Cl]	>100	9.8±1.6
[(tfmdppz)Pd(Me)(Caf)][SbF ₆]	5.1±0.1	1.6±0.1
Tfmdppz	10.2±4.8	7.2±2.7

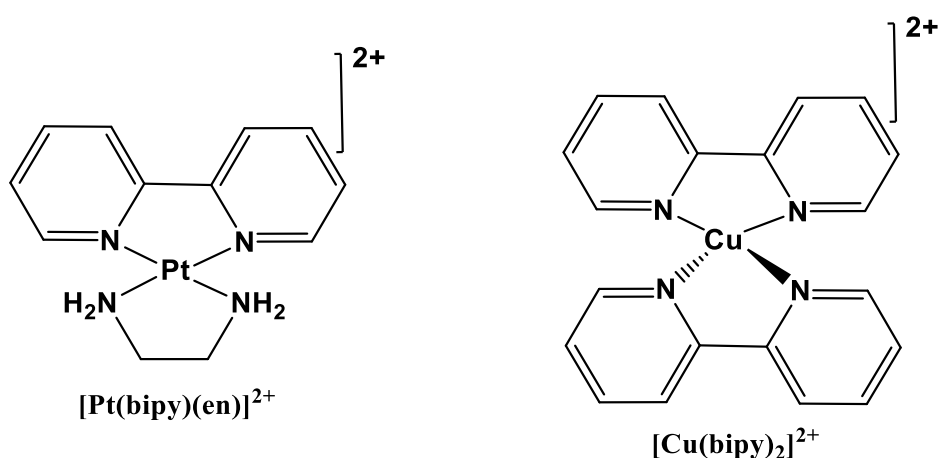
^aTempo de Incubação 72 h. ^bTempo de Incubação 96 h.

Adaptado de Butsch e colaboradores.

1.4.3. Complexos Tetraédricos

Em primeiros estudos, Nórden e colaboradores, estudando interações por intercalações de complexos de platina e cobre com ligantes bipyridínicos demonstraram que somente o complexo quadrático plano apresentava propriedades intercalativas, enquanto o complexo de cobre tetraédrico não, isso poderia estar atrelado com a disposição dos ligantes no complexo que acarretariam em maiores dificuldades de aproximação entre as bases do DNA, Fig. 1.14³⁸.

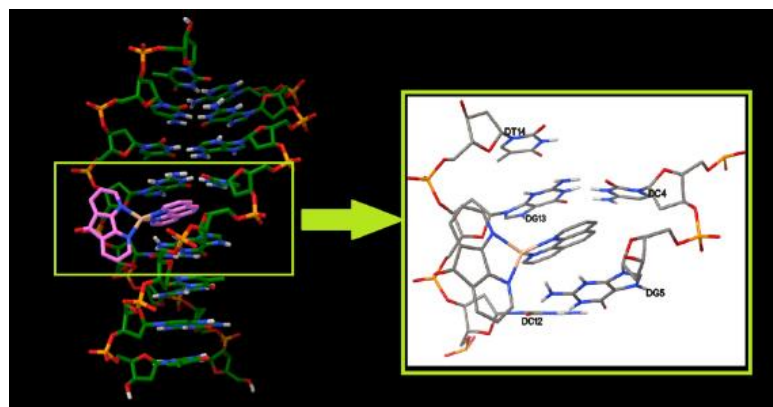
Figura 1.14. Metalintercalador quadrático plano e um não intercalador tetraédrico³⁸.



Adaptado de Nórden e colaboradores.

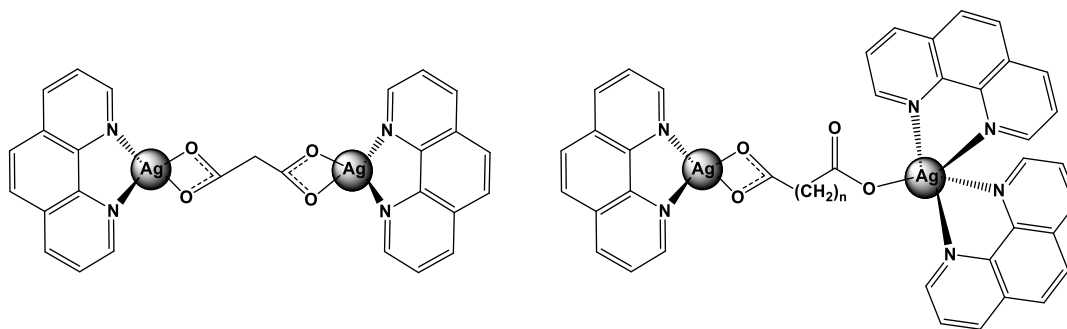
Mais recentemente Movahedi e colaboradores demonstraram que um complexo tetraédrico de prata com os ligantes planares 1,10-fenantrolina e 4,5-diazafluoreno-9-ona, foi capaz de atuar como intercalador, adicionalmente, por meio de Docking molecular observou-se que a intercalação pode ocorrer devido a inserção do ligante fenantrolina entre as bases citosina e guanina por meio de interações de van der Waals e ligações de hidrogênio³⁹ (Fig 1.15.).

Figura 1.15. Docking molecular da estrutura $[\text{Ag}(\text{daf})(\text{phen})]\text{NO}_3$ ³⁹.



Thornton e colabores, trabalhando com complexos bimetálicos de prata (I) contendo fenantrolinas e grupos dicarboxilatos em ponte (Fig. 1.16), demonstraram atividades anticâncer significativas frente às células tumorais de mama (MCF-7) e ovário (SKOV-3), sendo esta última resistente a vários quimioterápicos, inclusive a cisplatina. Reforçando que apesar da configuração geométrica ao redor do centro metálico ser importante, ela não é fundamental para a atuação biológica (Tabela. 1.2)⁴⁰.

Figura 1.16. Estruturas dos complexos bimetálicos constituídos do ligante planar fenantrolina e variação no número de ligações do ligante de ponte dicarboxilato⁴⁰.



Adaptado de Thornton e colaboradores.

Tabela 1.2. Atividades anticâncer para os complexos 1-20, ligantes, cisplatina e mitoxantrona⁴⁰.

Compound	Anticancer activity IC _{50a} (µM)			
	MCF-7		SKOV3	
	24 h	96 h	24 h	96 h
[Ag ₂ (prda)] (1)	9.75 ± 1.55	9.02 ± 2.37	15.6 ± 6.40	5.68 ± 3.56
[Ag ₂ (phen) ₂ (prda)]·H ₂ O (11)	49.7 ± 3.20	1.63 ± 0.14	46.2 ± 7.90	2.51 ± 0.35
[Ag ₂ (bda)] (2)	14.5 ± 1.70	13.6 ± 3.33	25.2 ± 9.60	4.92 ± 3.02
[Ag ₂ (phen) ₃ (bda)]·2H ₂ O (12)	39.8 ± 4.10	1.09 ± 0.29	34.8 ± 8.90	1.29 ± 0.25
[Ag ₂ (pda)] (3)	9.13 ± 1.10	10.6 ± 3.46	20.8 ± 10.1	9.58 ± 1.71
[Ag ₂ (phen) ₃ (pda)]·3H ₂ O (13)	29.8 ± 3.10	1.68 ± 0.58	40.3 ± 2.70	1.47 ± 0.68
[Ag ₂ (hxda)] (4)	11.2 ± 2.95	12.5 ± 3.56	41.5 ± 4.80	14.4 ± 1.95
[Ag ₂ (phen) ₃ (hxda)]·3H ₂ O (14)	35.5 ± 7.50	1.29 ± 0.37	25.1 ± 5.10	2.02 ± 0.33
[Ag ₂ (hpda)] (5)	17.9 ± 8.42	9.32 ± 2.90	30.3 ± 8.10	16.2 ± 0.81
[Ag ₂ (phen) ₃ (hpda)]·4H ₂ O (15)	14.0 ± 6.30	1.10 ± 0.24	39.7 ± 6.40	1.44 ± 0.27
[Ag ₂ (oda)] (6)	18.1 ± 5.06	9.43 ± 1.55	76.4 ± 2.88	14.4 ± 0.81
[Ag ₂ (phen) ₃ (oda)]·2H ₂ O (16)	21.4 ± 1.60	1.30 ± 0.39	37.6 ± 10.6	1.33 ± 0.49
Dicarboxylic acid ligands	> 100	> 100	> 100	> 100
Ag(I) acetate	57.8 ± 3.30	18.6 ± 0.71	88.0 ± 7.00	21.6 ± 11.2
Phen	43.6 ± 4.05	3.22 ± 0.80	57.9 ± 4.13	2.21 ± 0.52
Cisplatin	19.6 ± 1.44	< 1.60	76.4 ± 23.4	1.60 ± 0.15
Mitoxantrone	1.00 ± 0.09	< 0.039	1.05 ± 0.34	< 0.039

Adaptado de Thornton e colaboradores.

Face ao exposto, o trabalho desenvolvido teve como objetivo a síntese de complexos inéditos de prata (I) com ligantes derivados da fenantrolina, que possam atuar de forma intercalativa. Os ligantes foram planejados de maneira que tivessem em suas estruturas mais anéis aromáticos proporcionando um maior sítio de interação.

A escolha da prata se deu devido suas propriedades biológicas, já estabelecido o grande potencial do metal e seus compostos no combate a doenças infecciosas^{41,42}. Recentemente, houve um aumento significativo de trabalhos envolvendo

a síntese de complexos de prata com atividades antitumorais⁴⁰. Vale também considerar que os sais prata se apresentam menos tóxicos para o organismo humano do que sais rutênio, paládio e platina, por exemplo⁴³.

Sendo assim, neste trabalho buscou-se aliar as propriedades químicas e biológicas dos ligantes fenantrolínicos e da prata, para a obtenção de complexos do tipo $[Ag_n(R-L)_n(tu)_2](NO_3)_2$, sendo $n = 1$ ou 2 , R-L = ligante fenantrolínico estendido com diaminas aromáticas substituídas com CH_3-L_1 , $Cl-L_2$, NO_2-L_3 , $NON-L_4$, e $CN-L_5$. Para completar a esfera de coordenação optou-se pelo ligante auxiliar tiouréia (tu), capaz de formar ligações estáveis com o centro metálico, adicionalmente, este ligante auxiliar se mostrou de grande interesse, vide os trabalhos aqui supracitados, exercendo um papel funcional no sistema como um todo. Podendo evitar a inativação por ligações indesejáveis no meio celular, bem como, proporcionar interações supramoleculares que podem auxiliar a intercalação com o DNA⁴⁴.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de complexos de Ag (I) que possuam elevada citotoxicidade frente a células tumorais, atuando como possíveis agentes intercaladores do DNA. Para isso cumpriu-se os seguintes objetivos específicos:

- Síntese e caracterização de ligantes estendidos derivados da fenantrolina e dos complexos do tipo $[Ag_n(R-L)_n(tu)_2](NO_3)_2$, onde $n = 1$ ou 2 , R-L = ligante fenantrolínico estendido com diaminas aromáticas com substituintes CH_3 , Cl , NO_2 , $NON_{(furazano)}$, $CN_{(nitrila)}$ e $tu = tiouréia$;
- Determinação do coeficiente de partição;
- Ensaio de estabilidade via UV-Vis e RMN;
- Ensaio de interações dos complexos com CT-DNA e pBR322 via UV-Vis, Dicroísmo Circular e Eletroforese em gel;
- Investigação das atividades citotóxicas dos complexos nas linhagens tumorais de próstata (DU-145); carcinoma de ovário resistente a cisplatina (A2780cis) e não tumoral de pulmão (MRC-5).

3. Materiais e Métodos

3.1. Solventes e reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados nas sínteses e caracterizações (Tabela 3.1), não passaram por tratamentos prévios.

Tabela 3.1 Reagentes e Solventes e suas respectivas procedências.

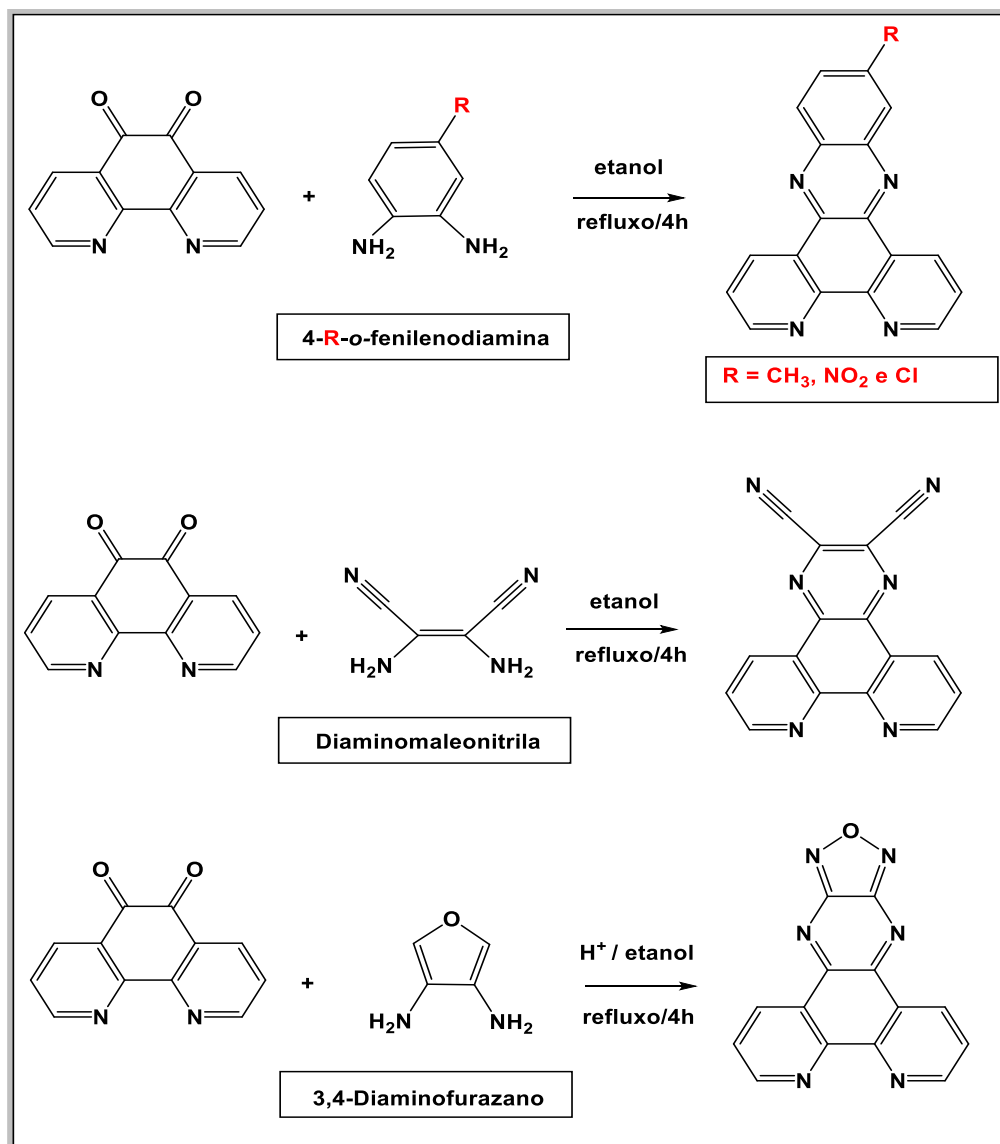
Reagente e Solvente	Procedência
Acetonitrila P.A.	Synth [®]
Metanol P.A.	Synth [®]
Etanol P.A.	Synth [®]
Clorofórmio P.A.	Synth [®]
Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A.	Synth [®]
Dimetilformamida (DMF) P.A.	Synth [®]
1-Octanol	Sigma-Aldrich [®]
Clorofórmio- <i>d</i> ₁ (99,8%)	AcrosOrganics [®]
DMSO- <i>d</i> ₆	Sigma-Aldrich [®]
Nitrato de Prata (> 99,0%)	Sigma-Aldrich [®]
1,10-fenantrolina monohidratada P.A.	Synth [®]
Tiouréia (>99,0%)	Synth [®]
4-metil-o-fenilenodiamina (>98,0%)	Fluka [®]
4-nitro-o-fenilenodiamina (98,0%)	Sigma-Aldrich [®]
4-cloro-o-fenilenodiamina (97%)	Sigma-Aldrich [®]
3,4-Diaminofurazan (97%)	Sigma-Aldrich [®]
Diaminomaleonitrila (>96%)	TCI [®]

3.2. Metodologia sintética

3.2.1. Síntese dos ligantes

Tanto o precursor 1,10-fenantrolina-5,6-diona quanto seus derivados foram obtidos a partir de adaptações da literatura⁴⁵⁻⁴⁷. As reações ocorreram em razões equimolares, sob refluxo durante quatro horas. (Esquema 3.1).

Esquema 3.1. Esquema sintético dos ligantes estendidos derivados da 1,10-fenantrolina.



3.2.1.1. Síntese do ligante 1,10-fenantrolina-5,6-diona.

Em um balão de 250 mL misturou-se 1,00 g (5,60 mmol) de 1,10-fenantrolina e 4,50 g (3,80 mmol) de KBr, e lentamente, sobre banho de gelo, adicionou aos sólidos, no balão, uma mistura de 20 mL de HNO_3 e 40 mL H_2SO_4 , rapidamente um gás castanho, bromo, foi liberado, a reação então foi deixada sob agitação à 90 °C, até que todo gás fosse desprendido. Após este período, a reação foi neutralizada utilizando-se carbonato de potássio, até que atingisse um pH entre 6-7. Todo o sólido

formado durante o processo foi filtrado a vácuo e posteriormente descartado. Em seguida, a solução resultante, passou por um processo de extração, utilizando-se dicloro metano e sulfato de sódio como agente secante, posteriormente filtrado o dicloro metano foi eliminado por rotaevaporação. **Rendimento:** 78 % (0,9100 g); **Cor:** Amarelo; **¹H (400 MHz – CDCl₃)** 9,10 (dd, 2H), 8,49 (dd, 2H), 7,58 (dd, 2H).

3.2.1.2. Síntese do ligante 11-metildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (CH₃-L₁).

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,200 g (0,952 mmol) de 1,10-fenantrolina-5,6-diona, dissolvida em 10 mL de etanol a quente. Em seguida, gota a gota, adicionou-se 0,116 g (0,952 mmol) da diamina 4-metil-*o*-fenilenodiamina, previamente dissolvida em 5 mL de etanol. A reação foi mantida sob refluxo durante quatro horas. Após este período, a solução teve seu volume reduzido por rotaevaporação, e usou-se etanol gelado para forçar a precipitação do composto de interesse. O sólido obtido foi filtrado sob vácuo e seco em um dessecador. **Rendimento:** 28% (0,0800 g); **Cor:** Bege; **P.F.:** 231-233 °C. **TF-IV:** 3062, 3012 (Ar-CH), 1496, 1358, 1072, 735, 411 (Ar-CC/CN) cm⁻¹; **¹H (400 MHz – CDCl₃)** 9,56 (d, 2H), 9,24 (d, 2H), 8,17 (d, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,76 (dd, 2H), 7,71 (d, 1H), 2,68 (s, 3H).

3.2.1.3. Síntese do ligante 11-clorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (Cl-L₂).

A síntese seguiu-se de maneira análoga ao item anterior, 0,200 g (0,952 mmol) de fendiona. (0,135 g, 0,952 mmol) 4-cloro-*o*-fenilenodiamina. Ao final da reação o volume de solvente foi reduzido no rotaevaporador. Observou-se a formação de precipitado quando se atingiu a temperatura ambiente. O sólido foi isolado por filtração a vácuo e lavado com etanol gelado. **Rendimento:** 46% (0,137 g); **Cor:** Roxo; **P.F.:** 262-263 °C. **TF-IV:** 3059, (Ar-CH), 1474, 1352, 1066, 739, 415 (Ar-CC/CN), 919 (CCI) cm⁻¹; **¹H (400 MHz – CDCl₃)** 9,51 (d, 2H), 9,25 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 8,22 (d, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,76 (s, 2H).

3.2.1.4. Síntese do ligante 11-nitrodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (NO₂-L₃).

A síntese seguiu-se de maneira análoga ao item anterior, a 0,200 g (0,952 mmol) de fendiona. (0,952 mmol, 0,145 g) de 4-nitro-*o*-fenilenodiamina. **Rendimento:** 82% (0,256 g); **Cor:** Amarelo; **P.F.:** 308-312 °C. **TF-IV:** 3102 (Ar-CH), 1559, 1479, 733, (CC/CN), 1522, 1342 (NO) cm⁻¹. **¹H (400 MHz – CDCl₃)** 9,54 (t, 2H), 9,29 (t, 2H), 9,20 (d, 1H), 8,64 (d, 1H), 8,44 (d, 1H), 7,80 (dd, 2H).

3.2.1.5. Síntese do ligante [1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina (NON-L₄).

Dissolveu-se 0,200 g (0,952 mmol) de fendiona em 10 mL de etanol a quente em um balão de fundo redondo (50 mL), então adicionou-se 1 mL de HCl (6 M) formando-se um precipitado amarelo, após 10 minutos, adicionou-se lentamente o ligante 3,4-Diaminofurazano (0,0953 g, 0,952 mmol), previamente dissolvido em 5 mL de etanol. A reação em alguns minutos passou de uma suspensão para uma solução amarela. A mesma foi mantida em refluxo por 4 horas. Ao final, um precipitado amarelo foi formado e isolado por meio de filtração a vácuo. Lavou-se o sólido com etanol gelado. **Rendimento:** 66% (0,174 g); **Cor:** Amarelo; **P.F.:** 343-345 °C. **TF-IV:** 3066 (Ar-CH), 1597, 1517, 1016, 607, 462 (Ar-CC/CN) cm⁻¹. **¹H (400 MHz – DMSO-d₆)** 9,49 (d, 2H), 9,29 (d, 2H), 8,07 (dd, 2H).

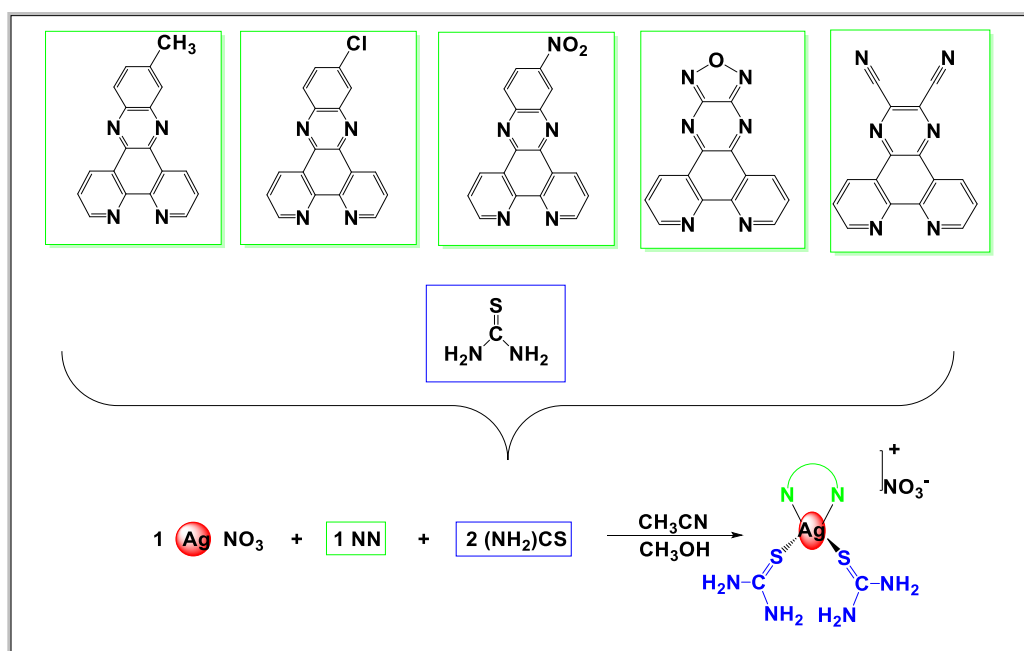
3.2.1.6. Síntese do ligante pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila (CN-L₅).

A síntese seguiu-se de maneira análoga ao item 3.2.1.2, 0,200 g (0,952 mmol) de fendiona foram dissolvidos em 10 mL de etanol a quente e em seguida, foram adicionados 0,103 g (0,952 mmol) de diaminomaleonitrila. O composto formado foi filtrado e lavado com etanol gelado. **Rendimento:** 52% (0,137 g); **Cor:** Marrom; **P.F.:** Decomp > 300 °C. **TF-IV:** 3111, 3068 (Ar-CH), 1586, 1379, 739, 415 (Ar-CC/CN), 2242 (CN_(nitrila)) cm⁻¹. **¹H (400 MHz – CDCl₃)** 9,46 (dd, 2H), 9,41 (dd, 2H), 7,80 (dd, 2H).

3.2.2. Síntese dos complexos heterolépticos de prata I

A síntese para obtenção dos complexos foi adaptada da literatura⁴⁸⁻⁵¹, em ambiente protegido de luz. Toda reação ocorreu *in situ* com uma razão molar de 1:1:2, de sal de prata, ligantes estendidos derivados da fenantrolina e tiouréia, respectivamente. Para todas as sínteses seguiu-se o mesmo plano sintético resumido no esquema 3.2.

Esquema 3.2. Esquema sintético dos complexos em equivalência 1:1:2.



3.2.2.1. Síntese do complexo [Ag₂(CH₃-L₁)₂(μ-tu)₂](NO₃)₂ (1).

Em um balão de 50 mL protegido de luz foram dissolvidos 0,0552 g (0,327 mmol) de AgNO₃ em 7 mL de acetonitrila, logo em seguida, uma suspensão do ligante CH₃-L₁ com 0,0967 g (0,327 mmol) em 5 mL de acetonitrila foi adicionada à solução contendo o sal de prata. A reação ficou sob agitação magnética em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, uma solução preparada com tiouréia, 0,0494 g (0,654 mmol) em 5 mL de metanol foi adicionada a solução, a reação foi mantida por mais 1 hora, nas mesmas condições. Ao final, um precipitado amarelo foi formado, o mesmo foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água, metanol e éter etílico. **Rendimento:** 42% (0,131 g); **Cor:** Amarelo; **P.F.:** 274-277 °C; **TF-IV:** 3454, 3032,

1626 (NH), 1455, 1354, 1067, 732, (Ar-CC/CN), 1379 (NO_3^-) cm^{-1} . Λ_M (DMF) = 160,3 $\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.2.2. Síntese do complexo $[\text{Ag}_2(\text{Cl-L}_2)_2(\mu\text{-tu})_2](\text{NO}_3)_2$ (2).

O procedimento de síntese seguiu o item descrito anteriormente. O sal de prata (0,0567 g, 0,336 mmol) reagiu com uma quantidade equimolar do ligante Cl-L₂ (0,113 g, 0,336 mmol). Após o período de 1h, foi adicionado 0,0510 g (0,672 mmol) de tiouréia. **Rendimento:** 50 % (0,164); **Cor:** Marrom; **P.F.:** 212-214 °C; **TF-IV:** 3458, 3008, 1616 (NH), 1466, 1353, 1077, 732 (Ar-CC/CN), 923 (CCl), 1358 (NO_3^-) cm^{-1} . Λ_M (DMF) = 163,6 $\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.2.3. Síntese do complexo $[\text{Ag}_2(\text{NO}_2\text{-L}_3)_2(\mu\text{-tu})_2](\text{NO}_3)_2$ (3).

O procedimento de síntese seguiu o item 3.2.2.1. 0,0515 g (0,304 mmol) de AgNO_3 . 0,0994 g (0,304 mmol) de $\text{NO}_2\text{-L}_3$. 0,0462 g (0,608 mmol) de tiouréia. **Rendimento:** 33 % (0,104 g); **Cor:** Amarelo; **P.F.:** 321-326 °C; **TF-IV:** 3376, 3064, 1628 (NH), 1566, 1478, 739 (Ar-CC/CN), 1520, 1338 (NO) cm^{-1} ; **^1H (400 MHz – DMSO- d_6)** 9,43 (t, 4H), 9,18 (s, 4H), 8,98 (s, 2H), 8,63 (d, 2H), 8,45 (d, 2H), 8,24 (s, 4H), 8,03 (s, 4H), 7,73 (s, 4H). Λ_M (DMF) = 160,2 $\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.2.4. Síntese do complexo $[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ (4).

O procedimento de síntese seguiu-se de maneira análoga aos itens anteriores. 0,0543 g (0,321 mmol) de AgNO_3 . 0,0879 g (0,0321 mmol) de NON-L₄. 0,0487 g (0,642 mmol) de tiouréia. **Rendimento:** 70% (0,111 g); **Cor:** Amarelo; **P.F.:** > 400 °C; **TF-IV:** 3074 (Ar-CH), 3365, 3149 (NH), 1598, 1475, 1016, 622, 460 (Ar-CC/CN), 1408, 1378 (CNO), 1316 (NO_3^-) cm^{-1} ; **^1H (400 MHz – DMSO- d_6)** 9,47 (d, 2H), 9,28 (d, 2H), 8,05 (dd, 6H), 7,51 (s, 4H). Λ_M = (DMF) 114,4 $\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$.

3.2.2.5. Síntese do complexo $[\text{Ag}_2(\text{CN-L}_5)_2(\mu\text{-tu})_2](\text{NO}_3)_2$ (5).

O procedimento de síntese seguiu-se de maneira análoga aos demais complexos. 0,0500 g (0,296 mmol) de AgNO_3 . 0,0834 g (0,0296 mmol) de CN-L₅.

0,0450 g (0,592 mmol) de tiouréia. **Rendimento:** 32% (0,0874 g); **Cor:** Amarelo pálido; P.F.: > 400 °C; **TF-IV:** 3375, 3117, 1629 (NH), 3073 (Ar-CH), 1598, 1398, 733, 429 (Ar-CC/CN), 2240 (CN), 1347 (NO₃⁻) cm⁻¹; **¹H (400 MHz – DMSO-d₆)** 9,55 (d, 4H), 9,35 (d, 4H), 8,25 (s, 4H), 8,19 (dd, 4H), 7,76 (s, 4H). **Λ_m (DMF) = 167,2 μScm²mol⁻¹.**

3.3. Métodos Instrumentais

3.3.1. Determinação do Ponto de Fusão

As medidas do ponto de fusão foram realizadas no equipamento MARCONI NA 301. Após a compactação da amostra macerada e com o auxílio de um capilar fechado, levou-se as amostras ao aquecimento em uma razão de 1 °C/min, sendo a temperatura máxima alcançada de 400 °C (Temperatura máxima do equipamento).

3.3.2. Análise elementar (CHN)

As análises foram feitas no equipamento Fisions da CE instruments sob responsabilidade da central analítica do Departamento de Química-UFSCar. O método empregado foi CHNS1908 e usado como padrão cistina e acetanilida.

3.3.3. Medidas de condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram feitas no equipamento MARCONI modelo MA 521 pertencente ao grupo LERCI (Laboratório de estrutura e reatividade de compostos inorgânicos) do Departamento de Química-UFSCar. Foram preparadas soluções dos complexos nas concentrações de 1,0x10⁻³ mol.L⁻¹ em DMSO. A condutividade do solvente foi mensurada e usada como branco.

3.3.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100, utilizou pastilhas de KBr (Brometo de potássio) como suporte. Usou o modo de 32 varreduras na região de 4000 a 400 cm⁻¹. Os

dados foram elucidados com o auxílio dos *softwares* Shimadzu IR Solution, 1.60 e Origin 8.0.

3.3.5. Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível

Os espectros foram obtidos com auxílio do espectrômetro SHIMADZU-1650PC. Os espectros foram obtidos a partir de soluções $1,0 \times 10^{-5}$ - 10^{-6} mol.L⁻¹ dos complexos em DMSO. A região de varredura escolhida foi de 1000 a 200 nm em caminho óptico de 1 cm em cubetas de quartzo. Os espectros foram elucidados utilizando-se *softwares* UVProbe 2.42 e Origin 8.0.

A técnica também foi usada para avaliar a estabilidade dos complexos em solução nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

3.3.6. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de RMN para ¹H e ¹³C{¹H} foi utilizado um espectrômetro BRUKER DRX 400MHz do Departamento de Química da UFSCar. Todos os dados foram elucidados com o auxílio do *software* MestReNova 6.0.2-5475. Os solventes utilizados nas análises foram o DMSO-*d*₆ e CDCl₃-*d*₁, na proporção 10 mg de amostra para 600 µL de solvente deuterado.

3.3.7. Coeficiente de partição (P)

O coeficiente de partição foi realizado a partir de uma concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ dos complexos em 1-octanol contendo 10% DMSO (para auxiliar a diluição dos complexos na fase orgânica), 750 µL dessas soluções foram misturadas com 750 µL de água destilada e em seguida, estas soluções foram incubadas a 37 °C por 24 horas, sob agitação a 200 rpm, utilizando o Termo-Shaker Agmaxx modelo AG-100. A referida análise foi realizada em triplicata, tendo em vista a absorbância média obtida das três soluções de complexo em 1-octanol utilizando espectrofotômetro UV-vis Shimadzu UV-1650PC. O valor da concentração dos complexos em 1-octanol e água foi determinado a partir da curva padrão previamente obtida. A medida de lipofili- cidade adotada é o log P, que é da fração entre a concentração de composto em 1-octanol pela concentração em água, dada pela equação 1⁵².

$$\log P = \log \frac{[\text{nOc}]}{[\text{H}_2\text{O}]} \text{ Equação 1.}$$

3.3.8. Difração de Raios X de monocristal

A difração de raios-X foi realizada pelo doutorando João Honorato (LERCI-UFSCAR) em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano (IFSC-USP) do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), utilizando-se um difratômetro Rigaku XtaLAB mini II, radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). A estrutura foi resolvida com o programa SHELXT usando métodos diretos, sucessivos mapas de Fourier-Diferença permitiram a localização dos átomos não hidrogênios. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL⁵³⁻⁵⁵. Detalhes específicos sobre a coleta de dados e os parâmetros para o complexo são fornecidos na tabela A1 em apêndice.

3.4. Ensaios Biológicos

3.4.1. Interações com o DNA

3.4.1.1. Interação com o CT-DNA via espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis)

Para realizar o teste de interação com DNA primeiramente preparou-se uma solução aquosa 10 mmol.L^{-1} de tris-HCl, 10 mmol.L^{-1} de NaCl (pH = 7,4) em temperatura ambiente. Nesse trabalho foi utilizada uma solução estoque de DNA do timo de bezerro (*calf thymus* / CT-DNA) 1 mg.mL^{-1} , preparada em solução tris-HCl a 4 - 9 °C. Antes do procedimento a solução foi estocada em geladeira a aproximadamente 9°C por 1 dia, para evitar degradação da biomolécula e aumentar a solubilidade. Para todas as análises fora verificada a razão da absorbância/comprimentos de onda 260-280 (A_{260} / A_{280}) acima de 1,8, indicando que o CT-DNA estava livre de proteínas contaminantes que podem prejudicar a interação com os compostos estudados⁵⁶. Para determinar a concentração molar de DNA na solução, foi utilizado a absortividade molar ($\epsilon = 6600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$)⁵⁷. Após a obtenção da concentração através da Lei de Labert-Beer (Equação 2) a solução foi diluída para 1,0 mM.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \text{ Equação 2.}$$

A constante de ligação (K_b) foi calculada utilizando a técnica de titulação espectrofotométrica. Neste experimento, a concentração dos complexos foi mantida fixa em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo a proporção de 2% de DMSO, e variando-se as concentrações de DNA de $6,0 \times 10^{-6}$ - $2,8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, vale salientar que as adições de DNA foram feitas tanto na cubeta de trabalho quanto na do branco para eliminar a absorbância da biomolécula. Por fim, as mudanças nas bandas foram monitoradas em $\lambda = 294\text{-}305 \text{ nm}$.

3.4.1.2. Interação com plasmídeo superenovelado

Para os testes, primeiramente, dilui-se os complexos em três concentrações, sendo elas 100, 10 e 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, posteriormente em um microtubo, 1 μL dessas soluções foram adicionadas a uma solução contendo 25 μL de água deionizada e 4 μL do plasmídeo pBR322, totalizando assim um volume final de ensaio de 30 μL . As soluções foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o tempo transcorrido as amostras foram retiradas do banho termostático e adicionou-se 15 μL de STEB (40 % de sacarose, 100 mmol.L^{-1} de Tris.HCl, pH = 7,5, 1 mM de EDTA, 0,5 mgmL^{-1} de azul de bromofenol), logo em seguida, 20 μL das amostras foram adicionadas nos respectivos poços do gel de agarose 1% (750 mg de agarose em 75 mL de TBE 1x). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 40 mA durante 12 horas. Após esse período, o gel foi adicionado em solução corada de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™ EZ, a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad.

3.4.1.3. Dicroísmo circular (CD)

Espectros de CD foram obtidos para amostras de DNA na presença de quantidades crescentes de compostos. As medidas foram registradas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO, utilizando cubeta de quartzo de 3 mL, na faixa 235 a 320 nm, com acumulação de 5 scans, largura de banda de 1,0 nm, velocidade de 100

nm/min e temperatura de 25 °C⁵⁸. A concentração de DNA foi mantida fixa em 5×10^{-5} mol.L⁻¹ enquanto a concentração dos complexos variou de 0 a 2×10^{-5} mol.L⁻¹.

Inicialmente, 20 mL de solução de DNA 5×10^{-5} mol.L⁻¹ em tampão tris-HCl (pH 7,3) foi preparada e distribuída igualmente em seis tubos de ensaio. Adições crescentes de composto em estudo foram feitas a cada tubo, partindo-se de uma solução fresca em concentração de 1×10^{-3} mol.L⁻¹ em DMSO, mantendo a concentração do solvente orgânico abaixo de 2% e de modo a obter razões molares de complexo/DNA na ordem de 0 a 0,4. As amostras foram incubadas a 37 °C por 24h e após o período as leituras foram realizadas.

3.4.2. Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares: DU-145 (câncer de próstata), A2780cis (carcinoma de ovário resistente a cisplatina) e MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão). As células foram cultivadas em meio RPMI1640 (DU-145 e A2780cis) ou DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (MRC-5), em ambos os meios foram adicionados 10% de FBS (soro fetal bovino). O cultivo foi realizado em de garrafas de plástico (Corning) armazenadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

A contagem das células foi realizada utilizando o corante Azul de Tripiano em uma câmara de Neubauer. Alíquotas de 150 µL contendo $1,5 \times 10^4$ células.mL⁻¹ foram adicionadas às placas de 96 poços. As placas foram mantidas por 24h em estufa, e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 µL de uma solução de DMSO contendo o ligante ou os complexos em diferentes concentrações. As concentrações finais nos poços foram de 0,8, 1,58, 3,16 6,25, 12,5, 25, 50, 100 µM; para os compostos mais ativos as concentrações precisaram ser ajustadas para: 0,03, 0,06, 0,13, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 µM. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48 horas^{36,58}.

Após a incubação, foram adicionados a cada poço 50 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolio) (1 mg mL^{-1}). E em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por 4h. Após este período, se retirou a solução de cada poço e adicionou-se 100 µL de DMSO. Por fim, foram realizadas as medidas de absorbância em um leitor de microplacas híbrido da BioTek

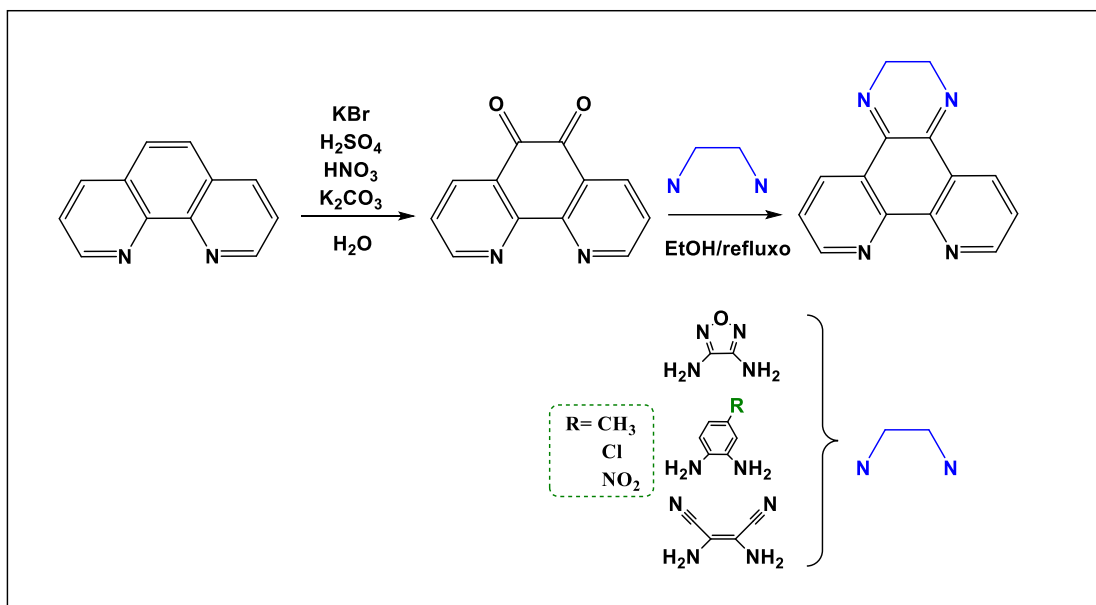
modelo SYNERGY H1. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 2010 e GraphPadPrism 6.01.

4. Resultados e Discussão

4.1. Aspectos físicos e químicos dos ligantes e complexos

Para a obtenção dos ligantes estendidos derivados da fenantrolina foi necessário a síntese prévia do precursor 1,10-fenantrolina-5,6-diona. A síntese dos ligantes de interesse estão resumidas no esquema 4.1, como se segue.

Esquema 4.1. Rota sintética dos ligantes estendidos derivados da fenantrolina.



A síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona é bastante descrita na literatura, trata-se de um composto bastante sensível ao pH. A janela de pH entre 6-7 é a ideal para sua obtenção sem impurezas. O sólido obtido foi recristalizado em etanol e sua estrutura confirmada por RMN de hidrogênio (¹H) (Fig. A1). A presença das duas carbonilas no anel aromático facilita a substituição por diaminas aromáticas, como as usadas nesse trabalho.

A próxima etapa de síntese constitui de uma reação equimolar entre as diaminas e fendiona sob refluxo em etanol. Todos os ligantes derivados da fenantrolina apresentam rendimentos comuns comparados com os da literatura, exceto o ligante CH₃-L₁, no qual se obteve um baixo rendimento provavelmente pela maneira de precipitação, descrito na metodologia, que consistiu em sucessivas recristalizações

em etanol gelado. Os ligantes estendidos apresentam solubilidade em clorofórmio, exceto o ligante substituído com a diamina furazano (NON-L₄) que é solúvel apenas em DMSO. As características físicas dos compostos estão resumidas na tabela 4.1.

O mecanismo geral da reação consiste no enfraquecimento da ligação C=O (carbonila) da fendiona, por conta de interações com o solvente prótico do meio, conseqüentemente ocorre o ataque nucleofílico ao mesmo carbono pelos pares de elétrons disponíveis do nitrogênio, havendo a formação de um intermediário tetraédrico, que posteriormente pelo rearranjo e abstração de prótons se tem a saída de água e a formação de uma imina, o mesmo ocorre com a outra carbonila e se tem o fechamento do anel aromático⁵⁹. Esquema 4.2.

Esquema 4.2. Mecanismo de substituições das carbonilas do ligante fendiona pelas diaminas aromáticas.

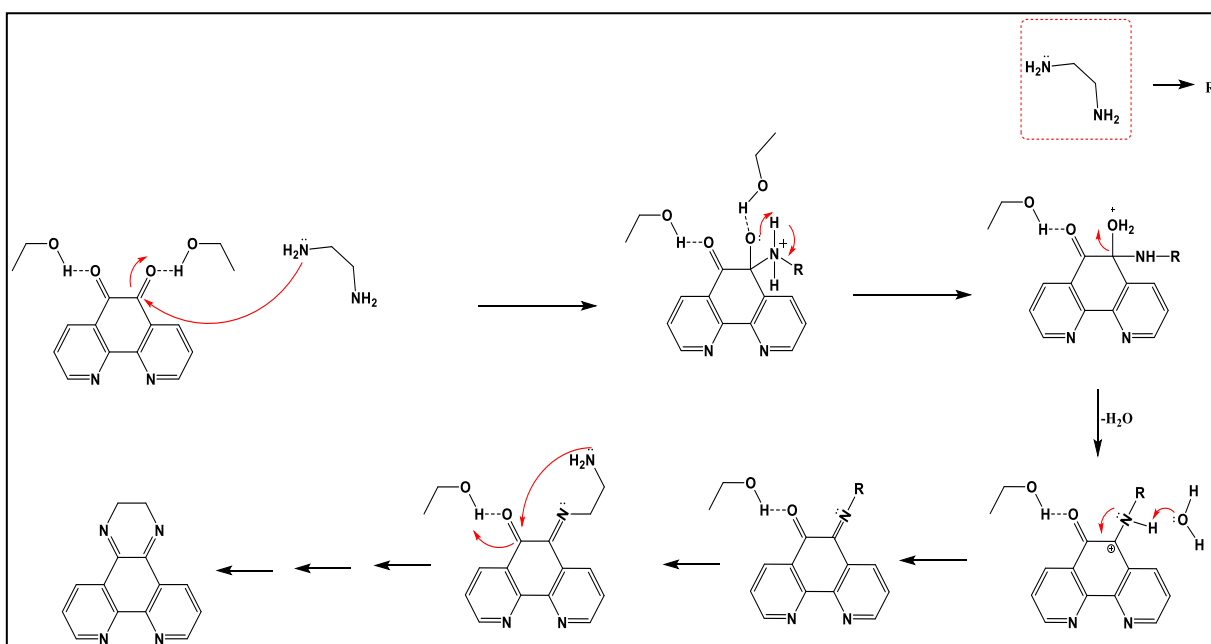


Tabela 4.1. Aspectos físicos dos ligantes, fórmulas moleculares e massas molares.

Ligante	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Coloração do sólido	Rendimento
CH ₃ -L ₁	C ₁₉ H ₁₂ N ₄	296,11	Bege	28%
Cl-L ₂	C ₁₈ H ₉ N ₄ Cl	316,05	Roxo	46%
NO ₂ -L ₃	C ₁₈ H ₉ N ₅ O ₂	327,08	Amarelo	82%
NON-L ₄	C ₁₄ H ₆ N ₆ O	274,06	Amarelo	66%
CN-L ₅	C ₁₆ H ₆ N ₆	282,07	Marrom	52%

Os complexos foram sintetizados *in situ* em um balão protegido de luz, devido ao caráter fotorredutor dos sais de prata quando expostos a luz. As sínteses partiram de misturas com razões 1:1:2 entre AgNO_3 , ligantes fenantrolínicos e tiouréia, respectivamente (Esquema 3.2). Ao final de todas as sínteses observou-se a formação de precipitados que posteriormente foram isolados por filtração, um dos aspectos físicos nas cores desses compostos, foram as mesmas cores provindas dos ligantes, que foram do amarelo ao marrom, isso é esperado já que transições d-d do metal não acontecem. Vale também destacar a estabilidade dos complexos quando expostos a luz e ao ar. Os compostos são solúveis apenas nos solventes dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF).

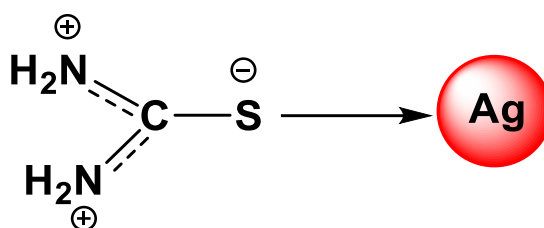
4.1.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho serviu para evidenciar o modo de vibração de grupos funcionais característicos presentes tanto nos ligantes como nos complexos, evidenciando o sucesso da coordenação.

Os espectros estão apresentados nas figuras abaixo (Figuras 4.2-4.6). A análise foi realizada comparando-se os estiramentos e deformações presentes na tiouréia e ligantes derivados da fenantrolina com seus respectivos complexos.

Para o complexo **(1)** (Fig. 4.2), é possível evidenciar bandas características dos ligantes: estiramentos C-H_{anel} e $\text{C-H}_{\text{metila}}$ do ligante $\text{CH}_3\text{-L}_1$ que aparecem na região de 3062 e 3009 cm^{-1} (espectro **2**), respectivamente, são parcialmente encobertas por bandas intensas e alargadas ($3413\text{-}3089\text{ cm}^{-1}$) νNH , νNH_2 do ligante tioamínico (espectro **3**), tal banda é essencial para a confirmação da ligação da tiouréia ao metal, assim como a presença da deformação “tesoura” δNH_2 em 1622 cm^{-1} , que é observável tanto no espectro **1** como no **3** da Figura 4.2; estiramentos $\text{C}=\text{S}$ são difíceis de identificar no espectro do complexo por seu enfraquecimento quando o enxofre se liga ao centro metálico e conseqüentemente podem ser encobertas pela presença de bandas intensas do outro ligante presente, em teoria o efeito esperado é o deslocamento dessas bandas para regiões de menores energias, devido ao efeito de retrodoação entre o centro metálico e o ligante, simultaneamente, espera-se um aumento na força de ligação entre $\text{C}=\text{N}$ (Fig. 4.1)^{60,61}.

Figura 4.1. Modo de coordenação do ligante tiouréia frente a Prata.

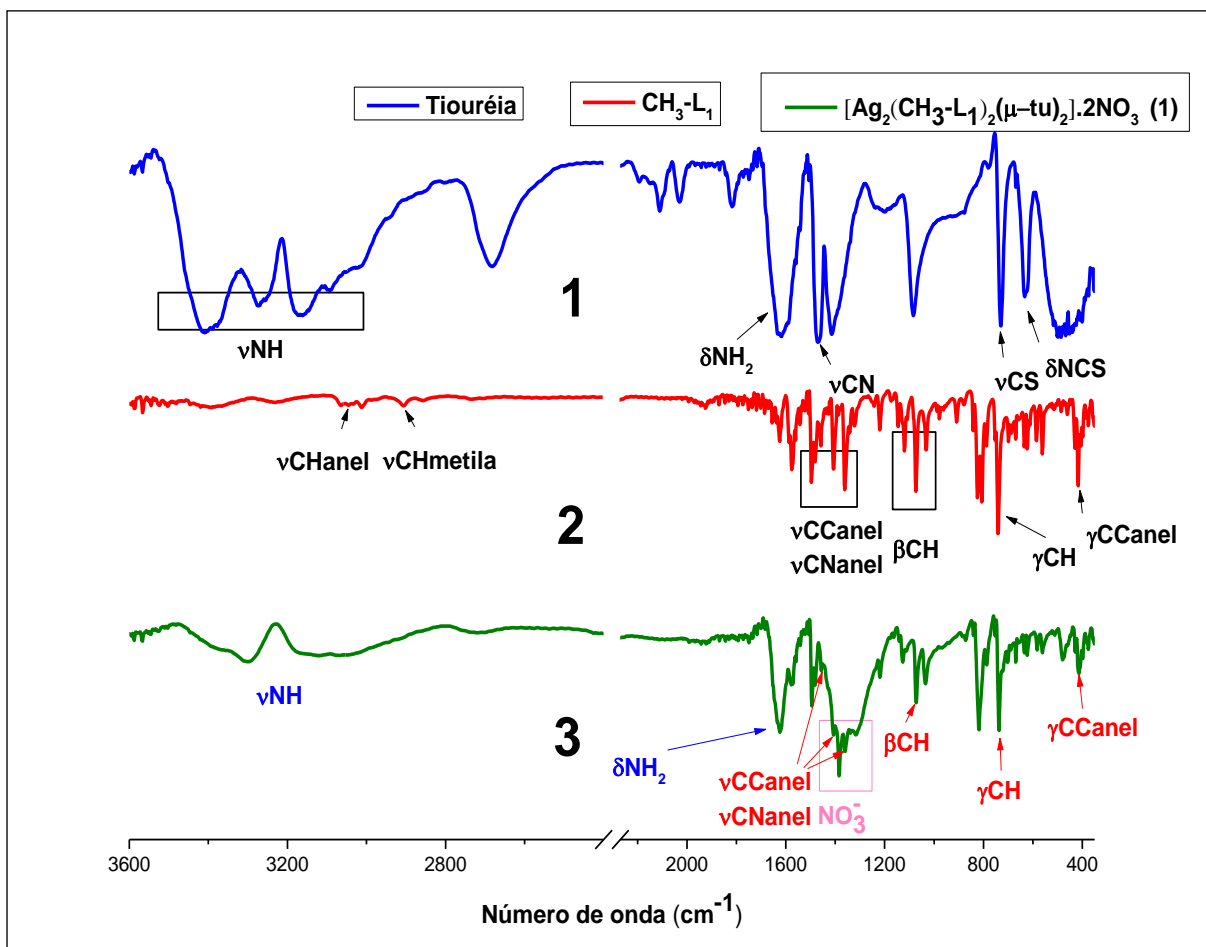


Fonte: Autor

As maiores contribuições para o espectro do complexo são provindas do ligante fenantrolínico, bandas do tipo β CH (deformação angular no plano) em 1067 cm^{-1} , γ CH e γ CC_{anel} (deformações angulares fora do plano) em 739 e 420 cm^{-1} , respectivamente. As bandas não sofrem grandes deslocamentos como se esperaria de ligações M-L, isso pode ser explicado pela grande densidade eletrônica dos íons Ag⁺ provinda de sua camada d totalmente preenchida, acarretando pequenos deslocamentos.

Também vale ressaltar a presença da banda referente ao íon NO₃⁻, em 1379 cm^{-1} no espectro **3**, o que corrobora com as análises de condutividade, quando o complexo se encontra com uma natureza eletrolítica. A tabela 4.2 resume os principais estiramentos e deformações entre ligantes e complexos.

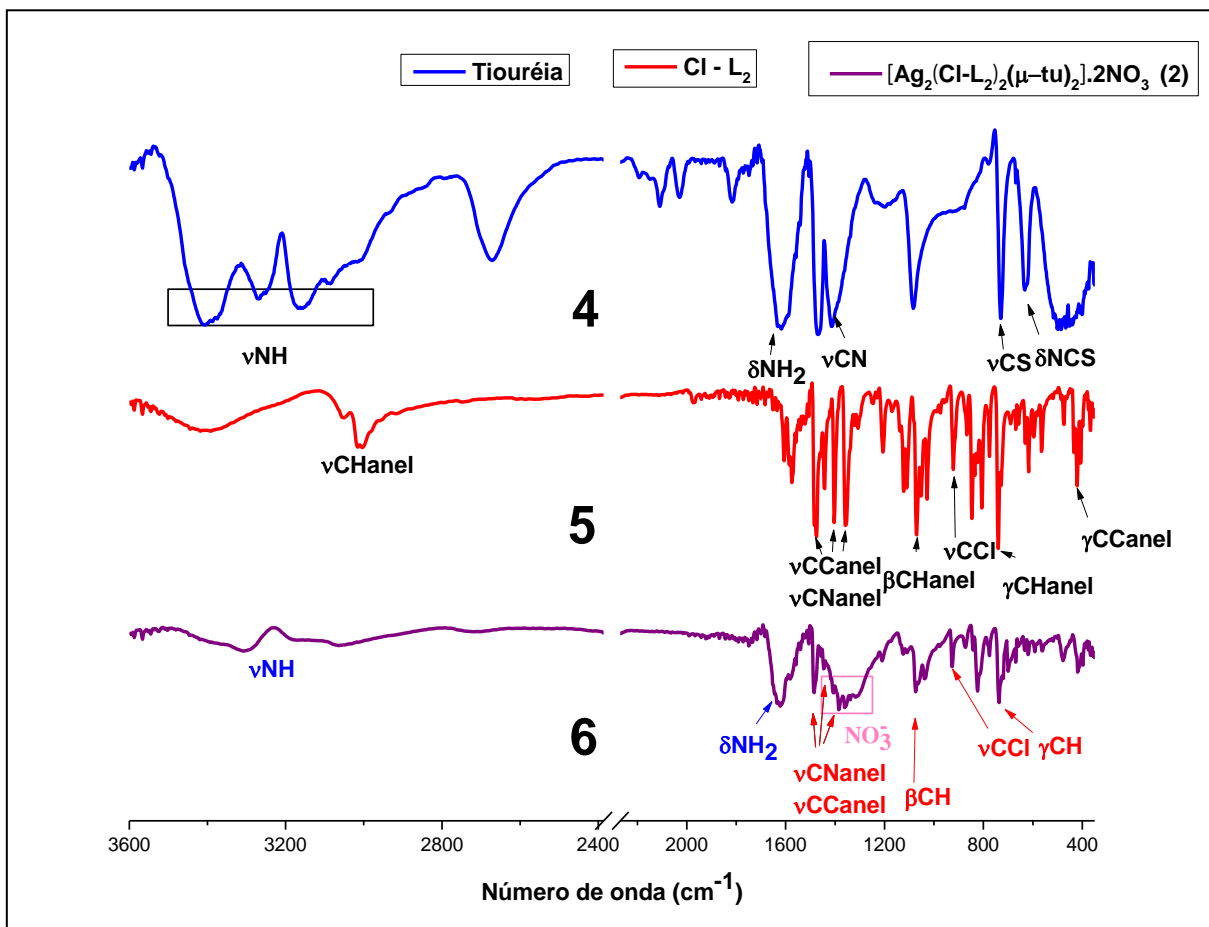
Figura 4.2. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes $\text{CH}_3\text{-L}_1$ e tiouréia.



Para os próximos espectros na região do IV, referente aos demais ligantes e respectivos complexos, as discussões serão diminutas em decorrência da similaridade entre eles, sendo apresentada apenas as principais variações.

O espectro de infravermelho do ligante Cl-L_2 e seu respectivo complexo **(2)** estão representados na Figura 4.3.

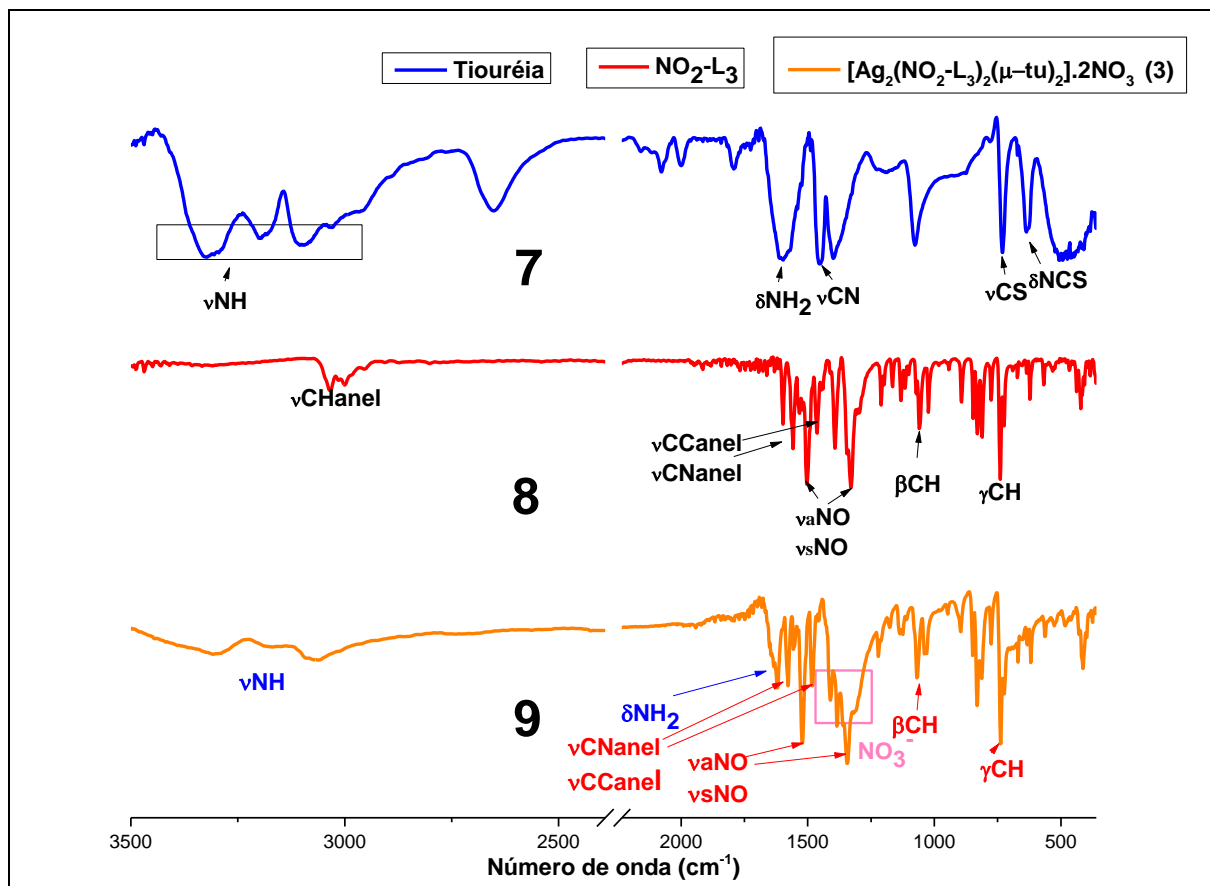
Figura 4.3. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo **2** contendo os ligantes Cl-L₂ e tiouréia.



Além das considerações descritas para o complexo **(1)**, ressalta-se o estiramento vCCI em 919 cm⁻¹, característico do substituinte cloreto no ligante aromático. Novamente, nota-se também o aparecimento de bandas provenientes do ligante tiouréia, vNH e vNH₂ (3458-3008 cm⁻¹) no espectro **6** (complexo **2**), esses alargamentos característicos dessas bandas ocorrem, provavelmente, devido a presença de moléculas de água na estrutura, favorecendo ligações de hidrogênio com as tiouréias.

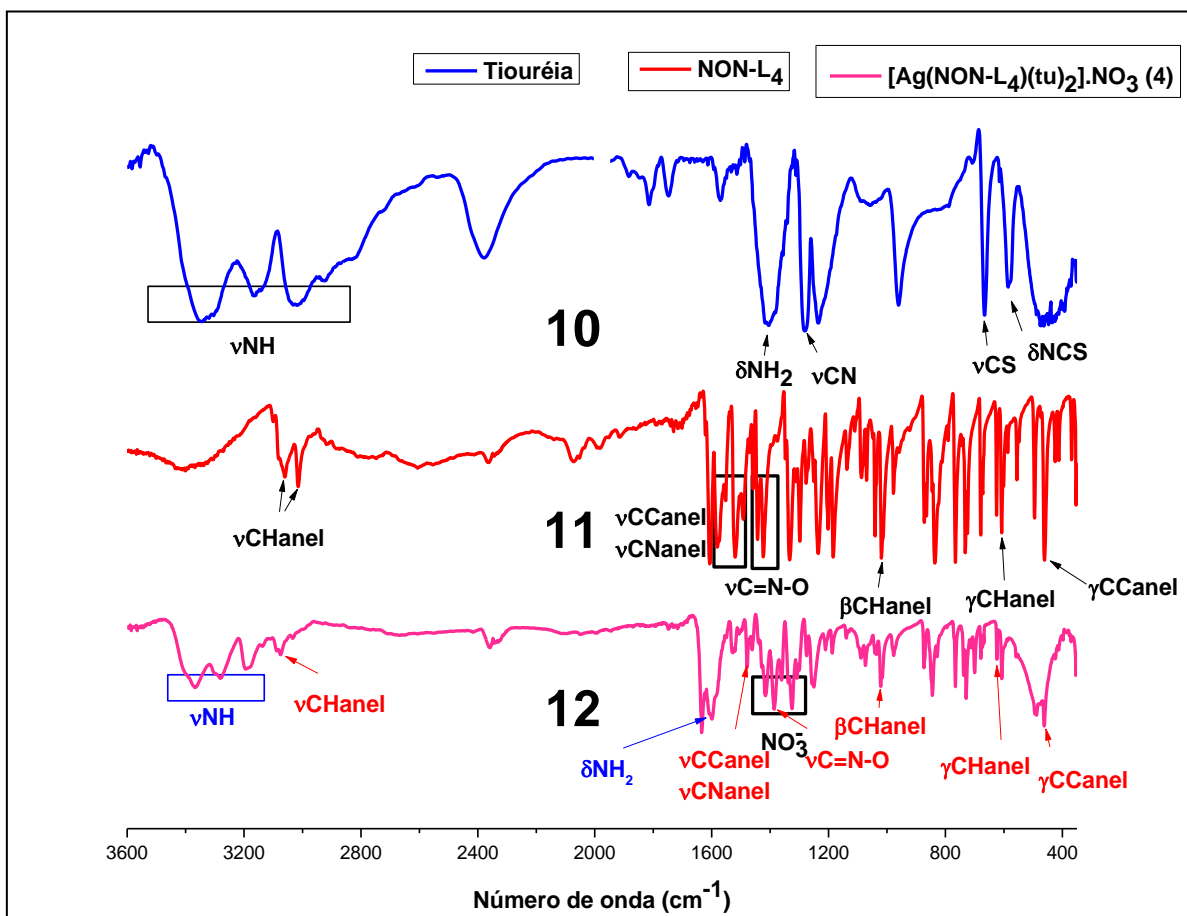
Os espectros para os complexos com grupo nitro (NO₂-L₃) e com anel furazano (NON-L₄) estão representados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.

Figura 4.4. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes $\text{NO}_2\text{-L}_3$ e tiouréia.



Os estiramentos do grupo nitro presente no anel aromático do ligante $\text{NO}_2\text{-L}_3$, possui dois modos: deformações assimétrica e simétrica, com números de onda em 1522 e 1337 cm^{-1} , respectivamente⁶², pode-se observar os mesmos estiramentos no complexo (espectro **9** da Fig.4.4) em 1520 e 1338 cm^{-1} , indicando a presença do ligante na esfera de coordenação. A deformação $\nu\text{C}=\text{N}-\text{O}$ do anel furazano (espectro **11**, Fig. 4.5) aparece em $1443\text{-}1423\text{ cm}^{-1}$ ⁶³, assim como no complexo (espectro **12**, Fig. 4.5) em $1439\text{-}1427\text{ cm}^{-1}$, vale ressaltar o aparecimento das vibrações do coligante tiouréia com fortes intensidades ($3365\text{-}3149\text{ cm}^{-1}$).

Figura 4.5. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes NON-L₄ e tiouréia.



Para os espectros contendo o grupo nitrila em sua estrutura aromática (Fig. 4.6) é possível observar deformação axial $\text{CN}_{\text{nitrila}}$ em 2242 cm⁻¹ para o ligante (Espectro 14) e 2240 cm⁻¹ no complexo (Espectro 15). Adicionalmente, é possível evidenciar as vibrações do anel aromático, νCC e νCN (1510-1398 cm⁻¹), bem como a presença do NO_3^- (1347 cm⁻¹) atuando como contra íon. Os principais estiramentos e deformações para os ligantes e complexos são resumidos na tabela 4.2.

Figura 4.6. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo contendo os ligantes CN-L5 e tiouréia.

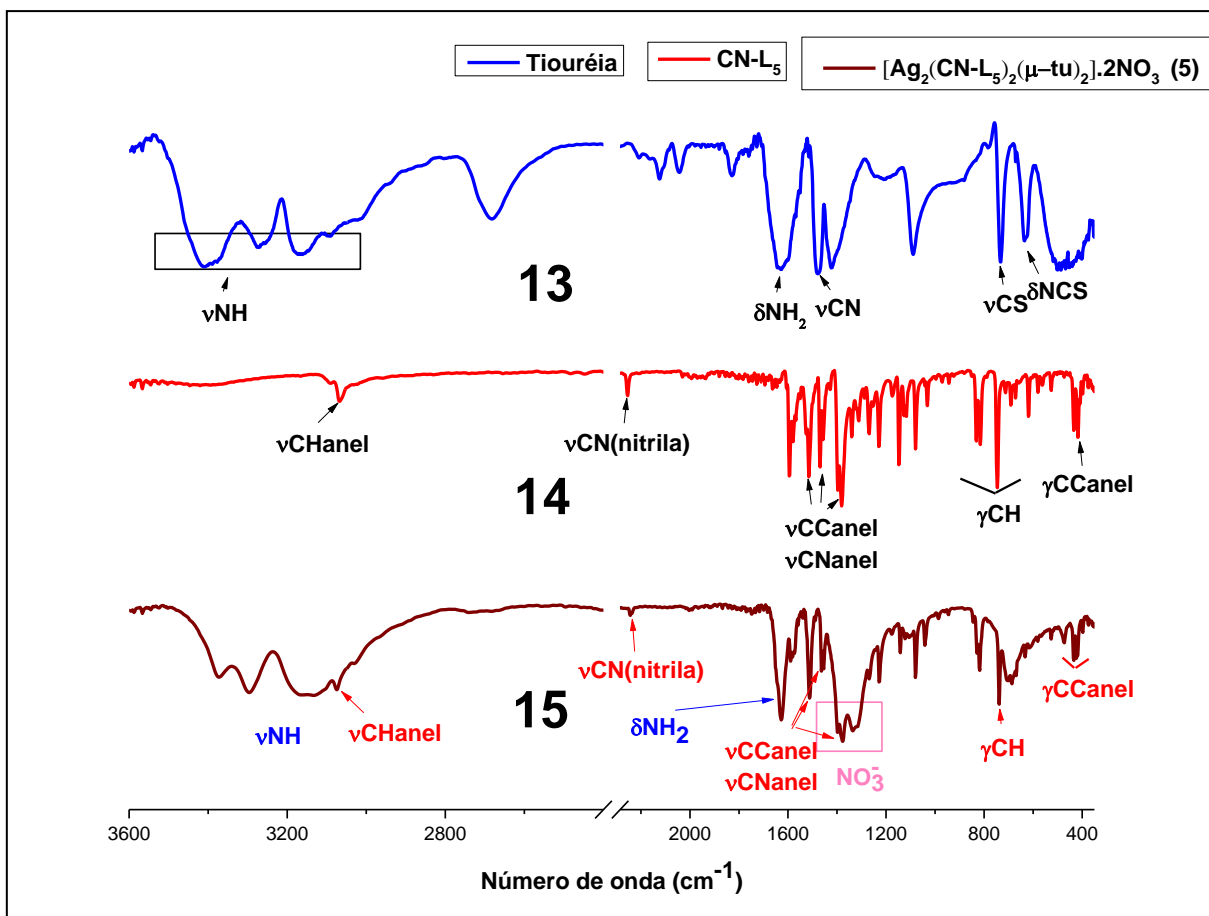


Tabela 4.2. Atribuições das principais bandas do infravermelho para os ligantes e complexos.

Atribuições	tu	Ligantes / Complexos Número de onda (cm ⁻¹)				
		1	2	3	4	5
vCH_{anel}	-	3062-12 / enc	3059 / enc	3102 / enc	3066 / 3074	3068 / 3072
vCC/CN_{anel}	-	1496	1474	1559	1597	1586
		1358 / 1455	1352 /	1479 /	1517 /	1379 /
		1354	1466	1566	1598	1580
			1353	1478	1475	1398
vaNO/sNO	-	-	-	1522	-	-
				1342 /		
				1520		
				1338		
βCH_{anel}	-	1072 / 1067	1066 / 1077	-	1016 / 1018	-
γCH_{anel}	-	735 / 735	739 / 732	733 / 739	607 / 622	739 / 733
γCC_{anel}	-	411/ 405	415 / enc	enc / enc	462 / 460	415 / 429
vCN_{nitrila}	-	-	-	-	-	2242 / 2240
tiouréia						
vNH_{tu}	3416	3454	3458	3376	3365	3375
		3009	3008	3064	3149	3117
δNH_{2tu}	1612	1626	1616	1628	enc	1629
vCN_{tu}	1463	Enc	enc	enc	enc	enc
vCS_{tu}	722	Enc	enc	enc	enc	enc
Nitrato (contra íon)						
NO₃⁻		1379	1358	1385	1316	1347

v= estiramento; **vs**= simétrico; **va**= assimétrico; **β**= deformação angular no plano; **δ**= deformação angular fora do plano; **enc**= encorbeto.

4.1.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)

4.1.3.1. RMN ^1H dos Ligantes

Os espectros dos ligantes aqui sintetizados, fora posteriormente comparado com aqueles já existentes na literatura^{26,45–47,64,65}.

Primeiramente se faz necessário uma discussão aprofundada dos espectros de RMN obtidos para os ligantes livres. Todas as análises foram feitas em CDCl_3 (exceto para o ligante NON- L_4 que fora feita em $\text{DMSO}-d_6$), e os seus respectivos espectros são apresentados a seguir (Fig. 4.7-4.11).

Figura 4.7. Espectro de RMN de ^1H para o ligante estendido derivado da fenantrolina ($\text{CH}_3\text{-L}_1$). Solvente: CDCl_3 .

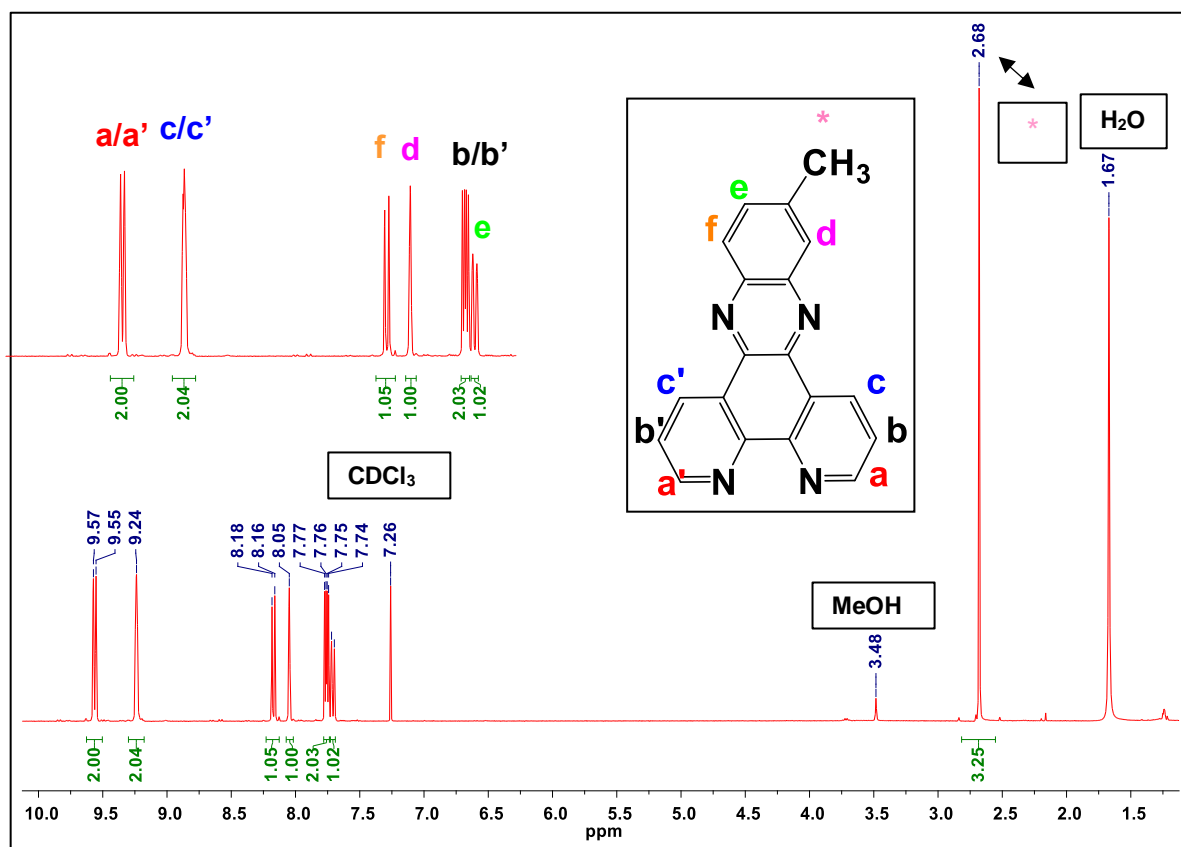


Figura 4.8. Espectro de RMN de ^1H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (Cl-L_2). Solvente: CDCl_3 .

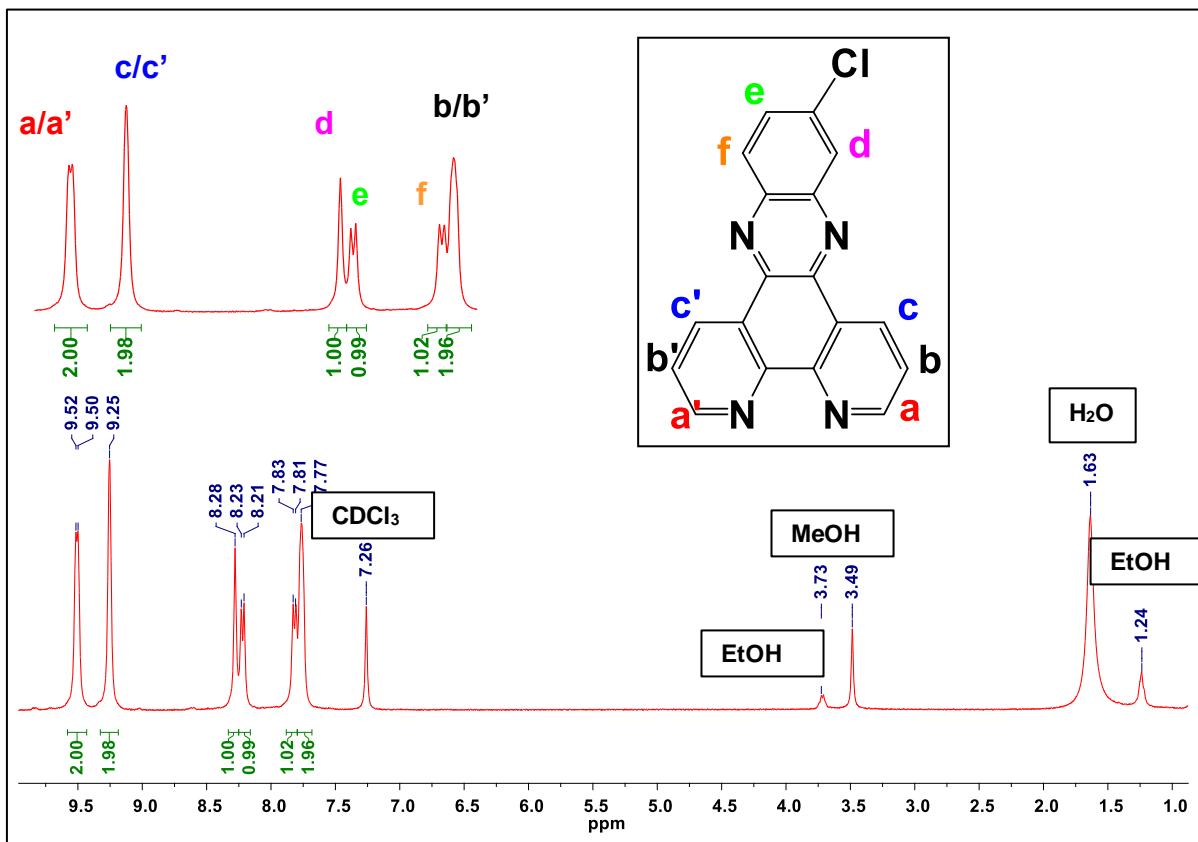
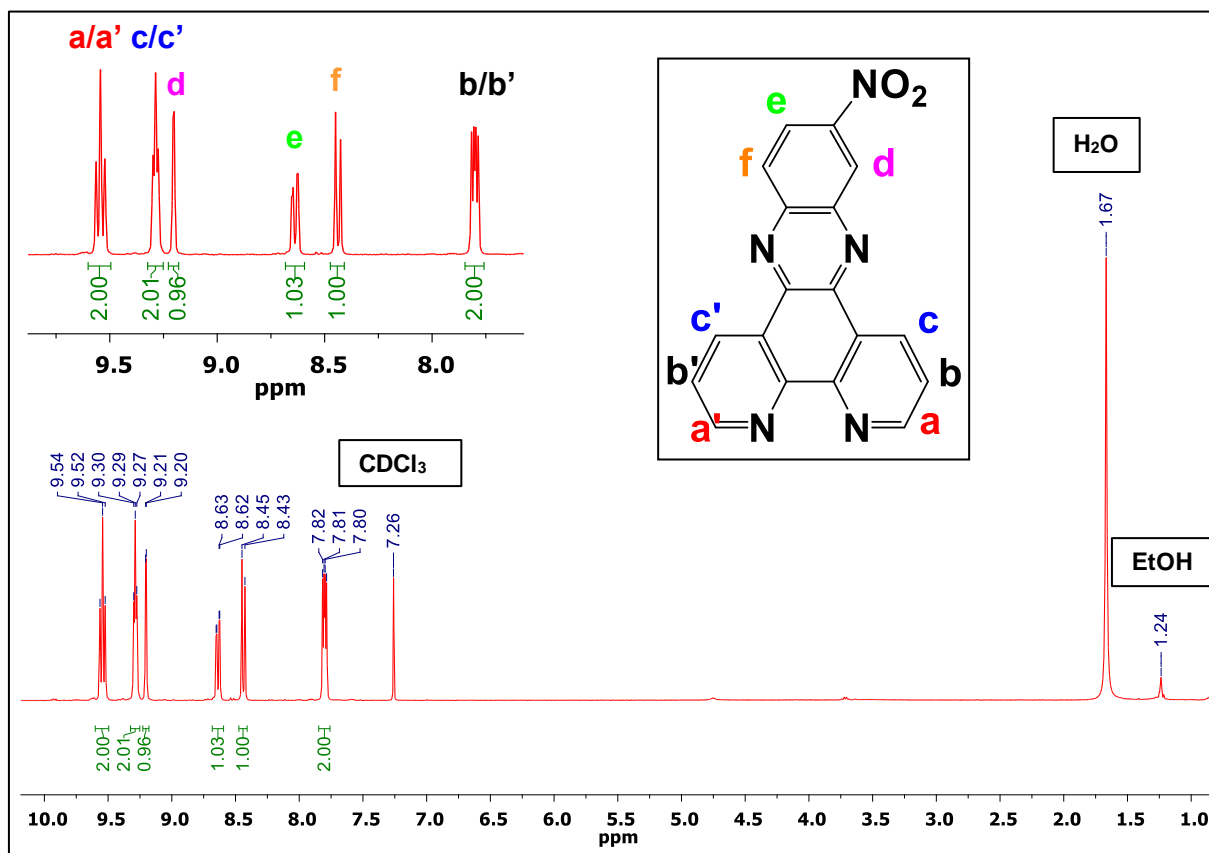


Figura 4.9. Espectro de RMN de ^1H para o ligante estendido derivado da fenantrolina ($\text{NO}_2\text{-L}_2$). Solvente: CDCl_3 .



Para os ligantes que sofrem pequenas mudanças devido a presença de grupos substituintes, figuras 4.7-9, são esperados a presença de seis sinais de hidrogênios aromáticos, para esses compostos as maiores diferenças estão nos deslocamentos dos hidrogênios que podem sofrer os efeitos doadores e retiradores de densidade eletrônica acarretados pela presença dos grupos R .

De modo geral, os deslocamentos dos hidrogênios da parte derivada da fenantrolina se diferenciam entre si devido ao ambiente que estão expostos, por exemplo para o ligante $\text{CH}_3\text{-L}_1$, os hidrogênios H_a/a' (9,56 ppm) sofrem maiores desblindagem por efeito indutivo em relação aos prótons H_b/b' (7,76 ppm) e H_c/c' (9,24 ppm) por conta da proximidade com os átomos de nitrogênios. São esperados que esses sinais se apresentem na forma de duplos dubletos, devido ao seu perfil de acoplamento, mas com o aumento da estrutura aromática, e as possibilidades de agregações entre os anéis, esses desdobramentos podem não ser evidentes, podendo alargar-se os sinais referentes aos hidrogênios da molécula. Os hidrogênios H_e são os que mais sofrem com a influência dos substituintes nos anéis aromáticos: no ligante substituído

pela metila esse ($\text{CH}_3\text{-L}_1$), o mesmo hidrogênio tem forte blindagem, em comparação com os demais ligantes, ocorrendo em 7,74 ppm, devido a característica doadora do grupo CH_3 ; para o ligante contendo o substituinte nitro ($\text{NO}_2\text{-L}_3$), retirador de densidade eletrônica, observa-se o sinal do hidrogênio *He* em 8,64 ppm, sendo caracterizado pelos maiores efeitos de desblindagem; o substituinte cloro (Cl-L_2), tem um efeito intermediário (8,22 ppm), o mesmo pode atuar como um grupo retirador, por conta de sua eletronegatividade e também doador pela possibilidade de ativação do anel por meio da doação de densidade⁶⁶.

Para os ligantes NON-L_4 e CN-L_5 (Fig. 4.10-11), são esperados somente três sinais de hidrogênios (seis hidrogênios equivalentes) de contribuição da parte fenantrolínica dos ligantes, essa equivalência é dada pela presença de um elemento de simetria C_2 (cortando a molécula). A tabela 4.3, resume os deslocamentos sofridos pelos hidrogênios dos anéis assim como suas constantes de acoplamentos.

Figura 4.10. Espectro de RMN de ^1H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (NON-L_4). Solvente: DMSO-d_6 .

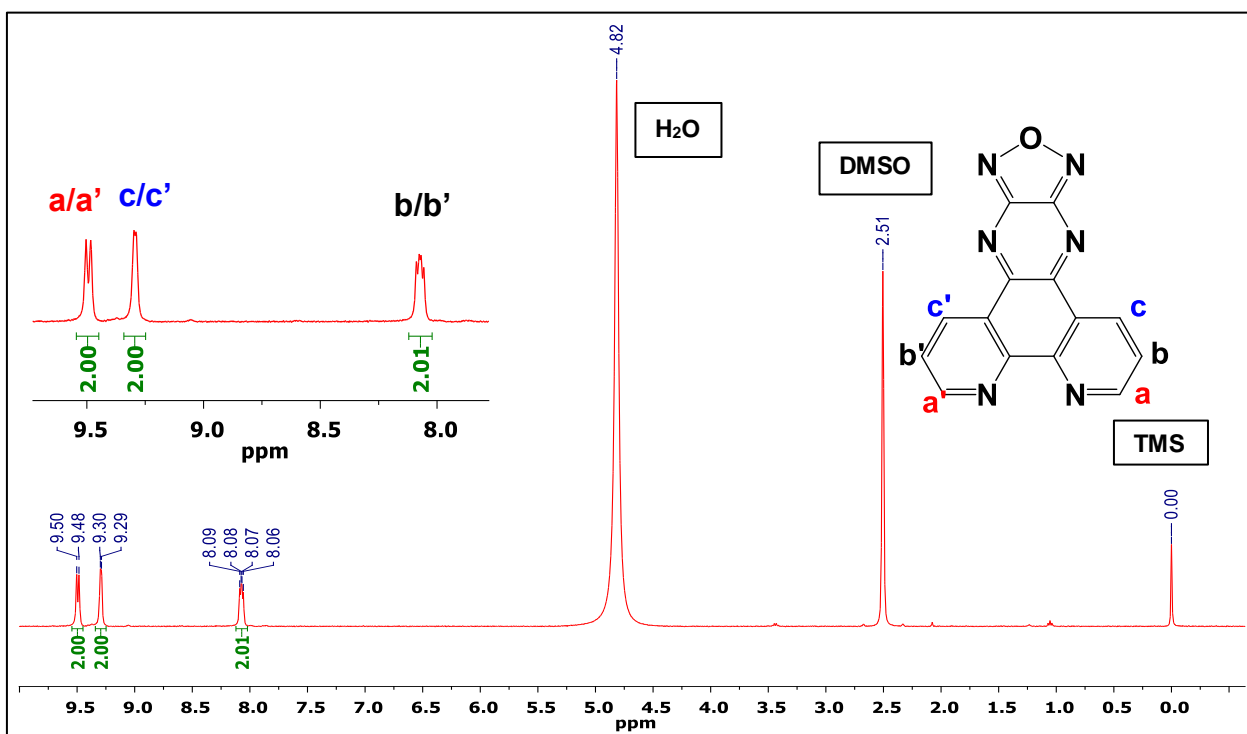


Figura 4.11. Espectro de RMN de ^1H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (CN-L₅). Solvente: CDCl_3 .

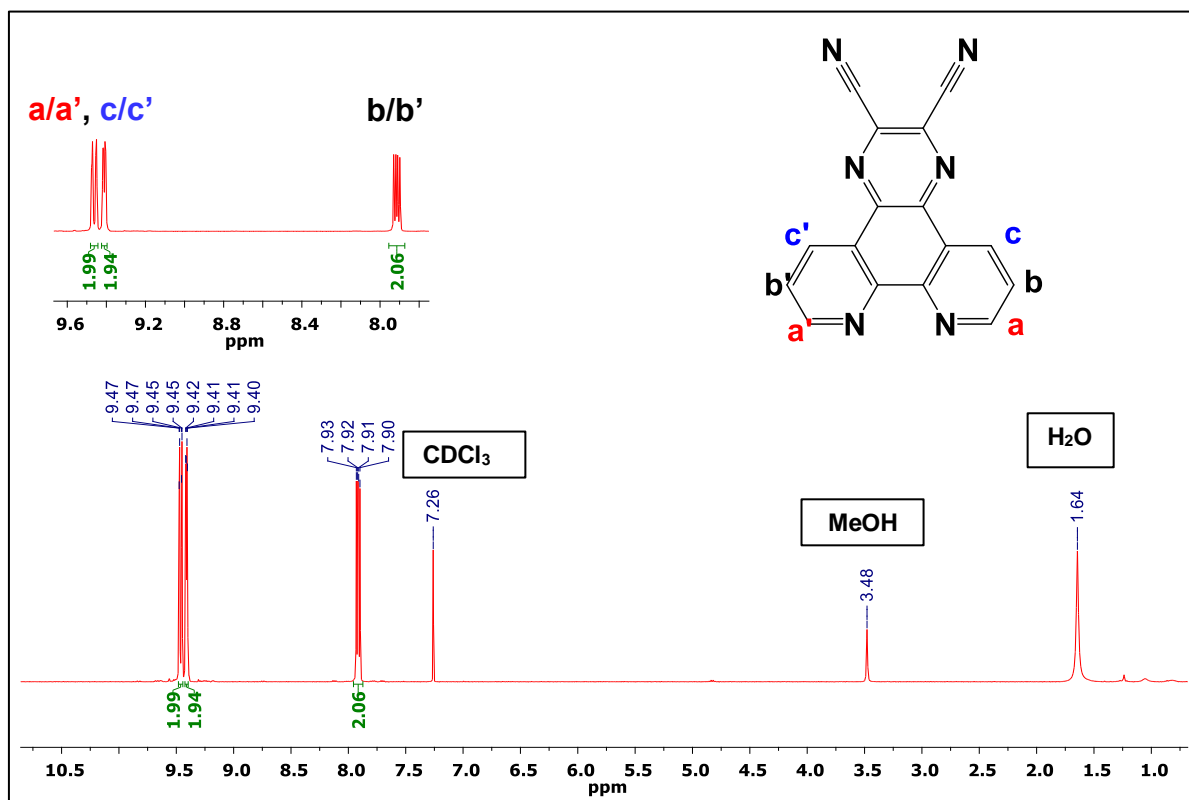


Tabela 4.3. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para os ligantes aromáticos derivados da fenantrolina.

^1H	Ligantes (δ ppm)				
	$\text{CH}_3\text{-L}_1$	Cl-L_2	$\text{NO}_2\text{-L}_3$	NON-L_4	CN-L_5
a/a'	9,56 (d, $J=8,2$ Hz, 2H)	9,51 (d, $J=6,1$ Hz, 2H)	9,54 (t, $J=8,1$ Hz, 2H)	9,49 (d, $J=7,8$ Hz, 2H)	9,46 (dd, $J=8,2, 1,6$ Hz, 2H)
b/b'	7,76 (dd, $J=8,2, 4,4$ Hz, 2H)	7,76 (s, 2H)	7,80 (dd, $J=8,1, 4,6$ Hz, 2H)	8,07 (dd, $J=7,8, 4,1$ Hz, 2H)	7,80 (dd, $J=8,2, 4,4$ Hz, 2H)
c/c'	9,24 (d, $J=4,4$ Hz, 2H)	9,25 (s, 2H)	9,29 (t, $J=4,6$ Hz, 2H)	9,29 (d, $J=4,1, 2H)$	9,41 (dd, $J=4,4, 1,6$ Hz, 2H)
d	8,05 (s, 1 H)	8,28 (s, 1H)	9,20 (d, $J=2,1$ Hz 1H)	-	-
e	7,71 (d, $J=8,7$ Hz, 1H)	8,22 (d, $J=8,8$ Hz, 1H)	8,64 (d, $J=9,3, 2,1$ Hz, 1H)	-	-
f	8,17 (d, $J=8,7$ Hz, 1H)	7,82 (d, $J=8,8$ Hz, 1H)	8,44 (d, $J=9,3$ Hz, 1H)	-	-
CH₃	2,68 (s, 3H)	-	-	-	-

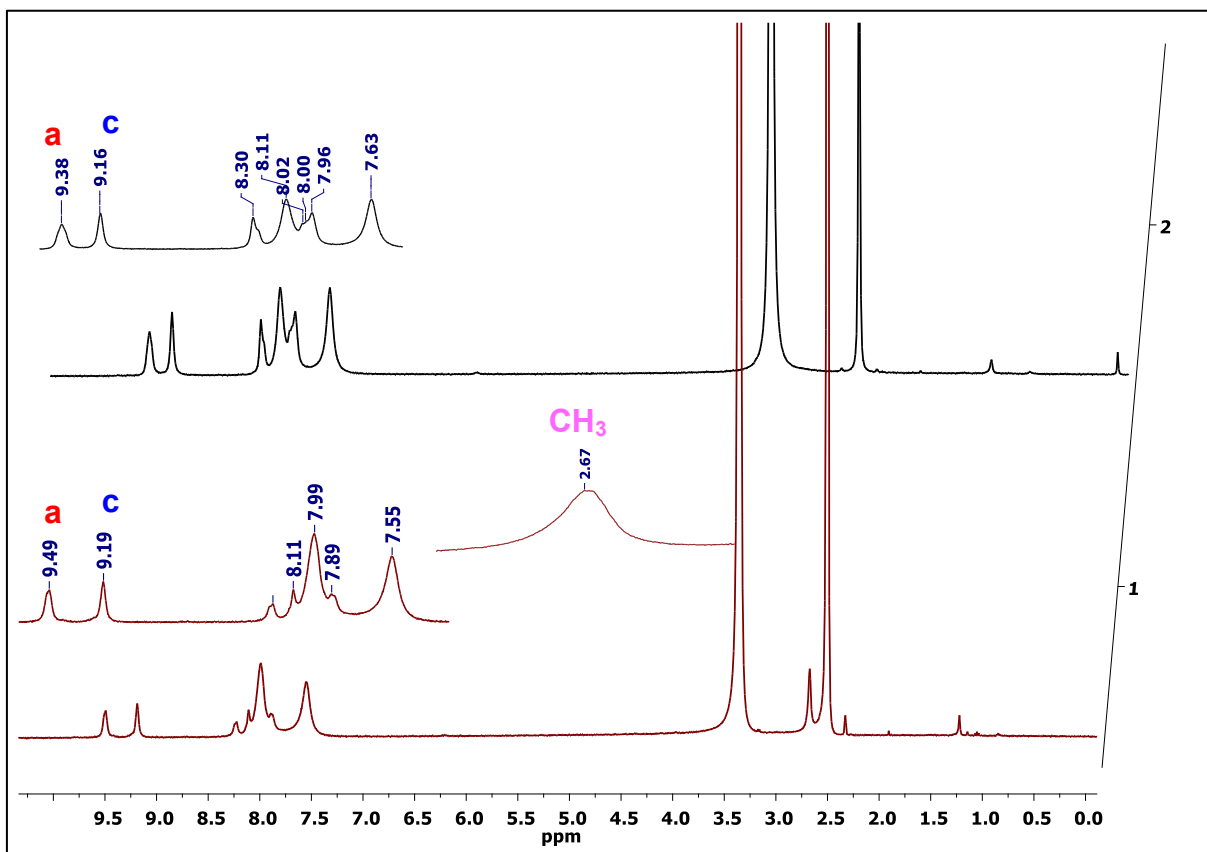
t= tripleto; **dd**= dublo dubleto; **d**= dubleto; **s**= singleto

4.1.3.2. RMN ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos

Para todos os complexos os espectros de RMN foram obtidos em DMSO- d_6 (Figuras 4.12-19).

Os compostos análogos, $[\text{Ag}_2(\text{CH}_3\text{-L}_1)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**1**) e $[\text{Ag}_2(\text{Cl-L}_2)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**2**) foram discutidos uma única vez, devido a semelhança de seus espectros de RMN de ^1H , fig. 4.12.

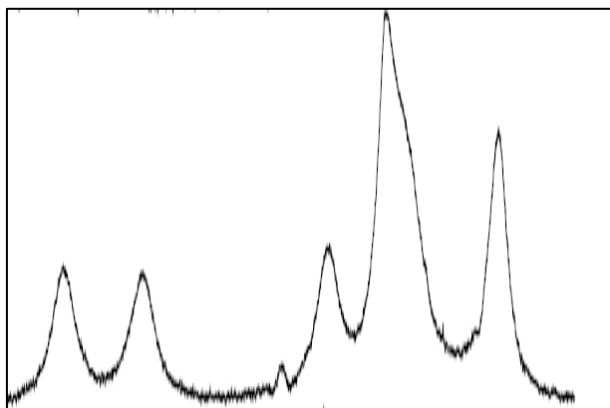
Figura 4.12. Espectro de RMN de ^1H para os complexos $[\text{Ag}_2(\text{CH}_3\text{-L}_1)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**1**) e $[\text{Ag}_2(\text{Cl-L}_2)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**2**). Solvente: DMSO- d_6 .



Observa-se que os sinais dos hidrogênios nos complexos se mostram alargados, sistemas parecidos encontrados na literatura exibiram os mesmos efeitos, quando analisados pela mesma técnica aqui descrita. Figura 4.13 (a,b).^{40,67}.

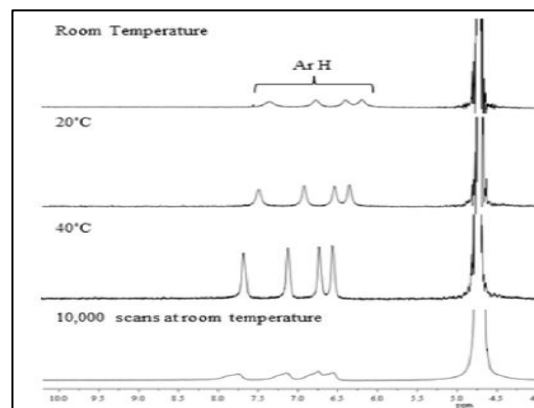
Figura 4.13. a) Complexo de prata I contendo ligantes do tipo dppz e tiouréia. b) Complexo de prata I contendo ligantes fenantrolina e dicarboxilatos.

a)



Adaptado de Segura.

b)



Adaptado de Thornton.

Esses efeitos podem ser condizentes a agregações estabelecidas por interações de empilhamentos π provindas dos anéis aromáticos, além de efeitos intramoleculares dinâmicos, como rotações envolvendo os ligantes presentes nos complexos^{40,67-71}, impossibilitando a determinação, de forma precisa, das integrais, assim como os das constantes de acoplamentos. Uma vez que alguns sinais esperados estão sendo sobrepostos, ainda sim, foi possível observar, por exemplo, os hidrogênios referentes a metila no complexo **1** em 2,67 ppm, além dos prótons caracterizados como *Ha* (9,49 e 9,38 ppm) e *Hc* (9,19 e 9,16 ppm) respectivamente nos complexos **1** e **2**.

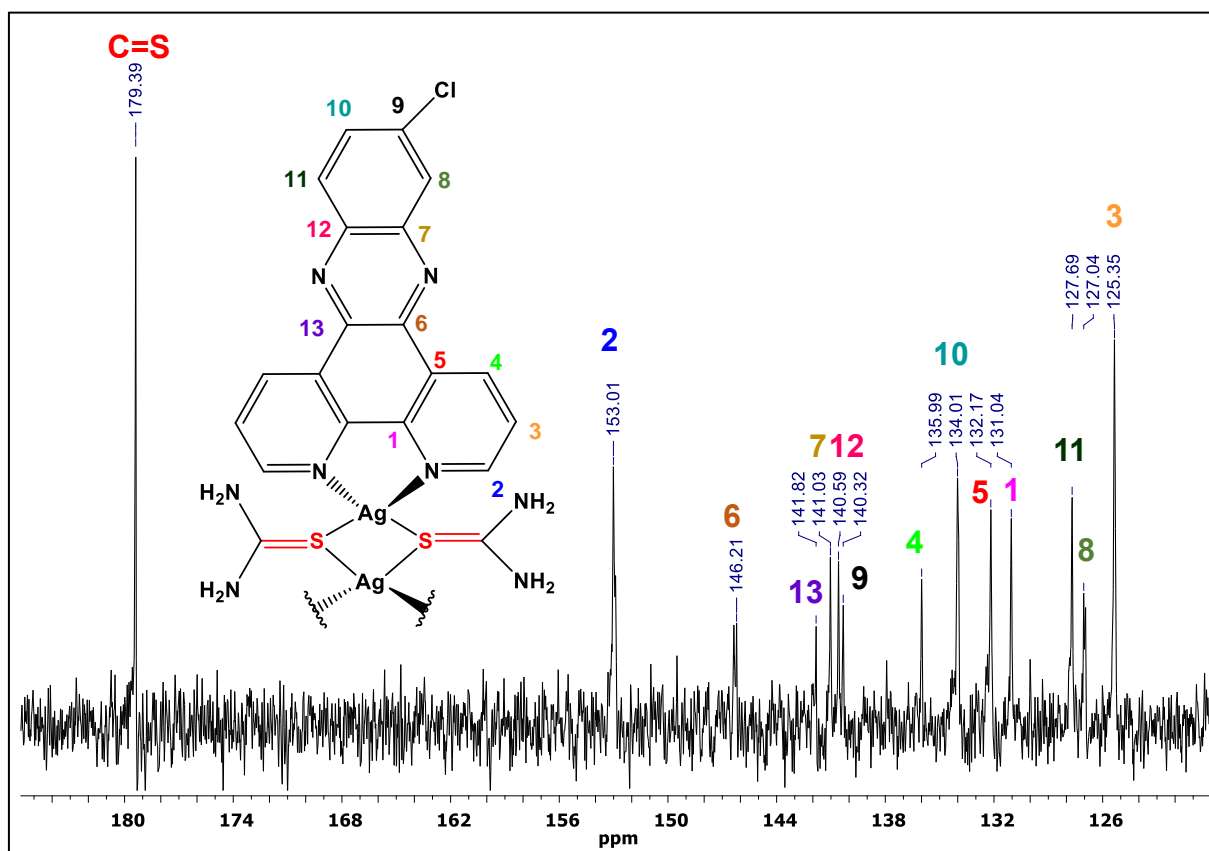
Desta forma, a análise de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ se mostrou uma ferramenta importante, uma vez que é realizada sem o efeito de acoplamentos de hidrogênios⁷². No entanto, o complexo **1** apresentou baixa solubilidade, sendo possível apenas a determinação dos sinais mais intensos (Fig. A2, em apêndice), como por exemplo o sinal em 21,63 ppm, referente a metila do anel aromático e o sinal em 179,59 ppm, atribuído ao carbono ligado ao enxofre da tiouréia.

Em relação ao complexo **2** foi possível a obtenção de um espectro de carbono com melhor resolução, (Fig. A3), a Fig 4.14 apresenta a região de interesse do espectro para melhor entendimento e discussão dos sinais referentes a cada carbono presente no composto.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (Fig 4.14), foi possível identificar treze sinais para os carbonos presentes na estrutura do ligante fenantrolínico. Os carbonos mais desblindados ($^{13}\text{C}= 2, 6$ e 13) são referentes a ligações próximas aos nitrogênios, ademais os sinais dos carbonos do anel policíclico consistiram nas faixas de 153 a 125 ppm, condizentes com deslocamentos encontrados na literatura para sistemas complexos parecidos⁷³. Vale também destacar a presença de desdobramentos em alguns carbonos ($^{13}\text{C}= 6$ e 8) como consequência da assimetria que esses ligantes planares exibem quando se coordenam.

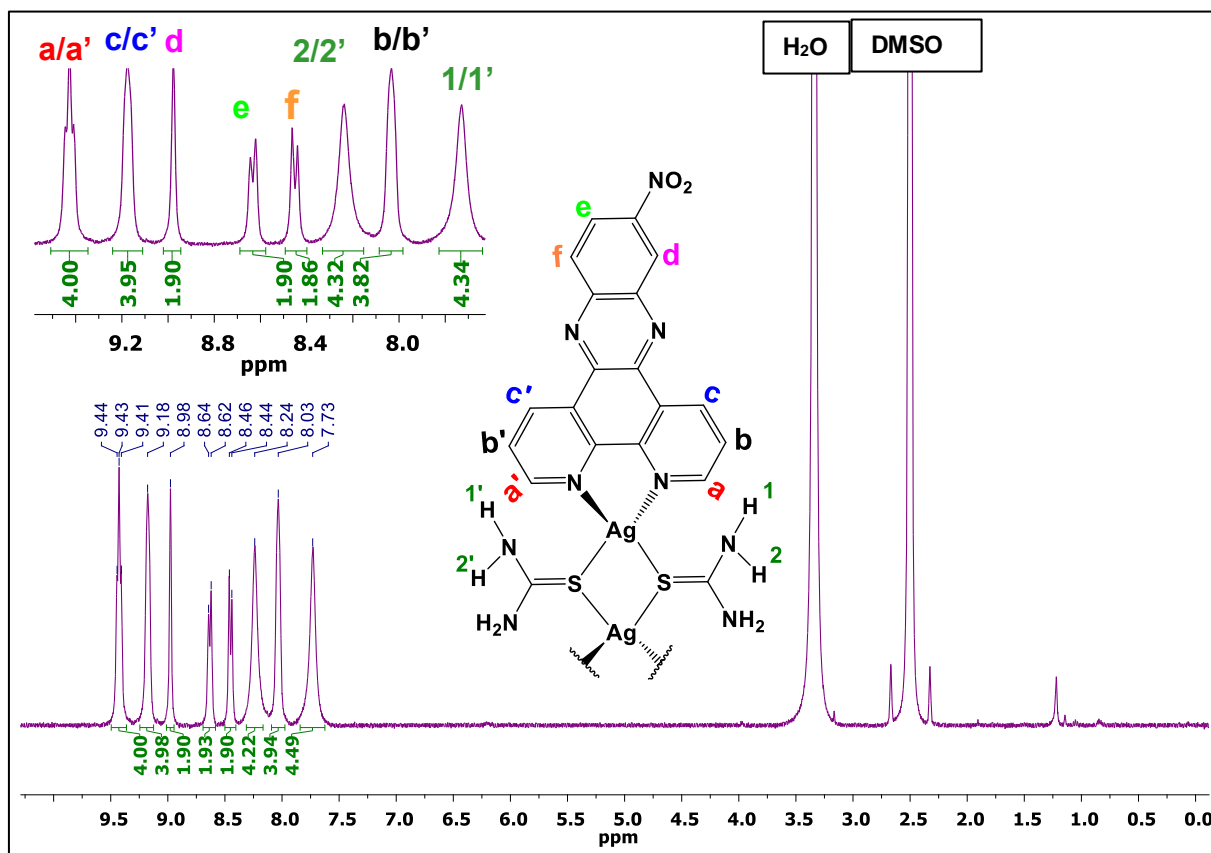
A presença do carbono em 179,39 ppm é um sinal diagnóstico para evidenciar a coordenação do ligante tiouréia ao centro metálico. Nota-se um deslocamento de 4 ppm, quando se comparado ao ligante tiouréia livre (183,83 ppm, fig.A5), deixando o carbono mais blindado, que é devido a um pequeno aumento de densidade eletrônica em seu entorno.

Figura 4.14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ag}_2(\text{Cl-L}_2)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**2**). Solvente: $\text{DMSO-}d_6$.



O complexo **(3)**, fig 4.15, contendo o grupo nitro, apresentou três sinais referentes aos hidrogênios fenantrolínicos, que pela simetria, engloba os hidrogênios *Ha/a'* (9,38 ppm), *Hb/b'* (8,03 ppm) e *Hc/c'* (9,18 ppm). Os outros três sinais são atribuídos aos hidrogênios da parte assimétrica derivada da diamina *Hd* (8,98 ppm), *He* (8,63 ppm) e *Hf* (8,45 ppm). Também foi possível observar a presença de dois sinais alargados que representam os hidrogênios pertencentes as duas tiouréias coordenadas a prata, *H1/1'* e *H2/2'*, ocorrendo respectivamente em 7,73, 8,24 ppm. Ademais, esses deslocamentos químicos se encontram deslocados em relação ao ligante livre (Fig. A4), evidenciando a coordenação, em decorrência da desblindagem diante da doação de densidade eletrônica do ligante para o metal. As integrais calculadas mostraram uma relação de 1:1 entre os sinais dos hidrogênios fenantrolínicos e os hidrogênios da tiouréia, o que pode indicar a formação de uma espécie bimetálicas, com os ligantes tiouréias atuando em ponte unindo dois íons de prata^{40,48,49}. Apesar de alargamentos de alguns sinais foi possível determinar o acoplamento entre os prótons *He* e *Hf*, caracterizado com um J^3 (acoplamentos de hidrogênios vizinhos via três ligações) de 9,2 Hz. Devido à baixa solubilidade não foi possível a obtenção do espectro de RMN de ¹³C para o complexo.

Figura 4.15. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Ag}_2(\text{NO}_2\text{-L}_3)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**3**). Solvente: DMSO-d_6 .



O espectro do complexo (**4**), constituído pelos ligantes NON-L₄ e tiouréia, está apresentado na Fig. 4.16, observa-se a presença de três sinais, referentes aos seis hidrogênios fenantrolínicos (*Ha/a'*, 9,47 ppm, *Hb/b'*, 8,05 ppm e *Hc/c'*, 9,28 ppm) e mais dois sinais alargados referentes a duas tiouréias coordenadas (*H1/1'*, 7,52 ppm e *H2/2'*, 8,05 ppm). Vale salientar a sobreposição dos hidrogênios caracterizados como *b/b'* e *2/2'*, dificultando a determinação precisa das integrais. Para este complexo, as integrais obedeceram a uma proporção 1:2, NON-L₄ e tiouréia, ou seja, que é condizente com uma estrutura monometálica.

A partir da obtenção de um espectro com resolução adequada, foi possível obter as constantes de acoplamento para os prótons aromáticos, sendo todas do tipo J^3 : entre os hidrogênios *Ha* e *Hb* com um $J^3 = 8,0$ Hz; *Hb* e *Hc* com um $J^3 = 4,4$ Hz. Também poderia se esperar acoplamentos a longa distância do tipo J^4 entre os prótons *Ha* / *Hc*, mas como já mencionado, a coordenação provocou uma diminuição na resolução, dificultando na obtenção de alguns parâmetros. A Figura 4.17 representa o espectro de RMN de carbono do complexo (**4**).

Figura 4.16. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]$ (**4**). Solvente: DMSO-d_6 .

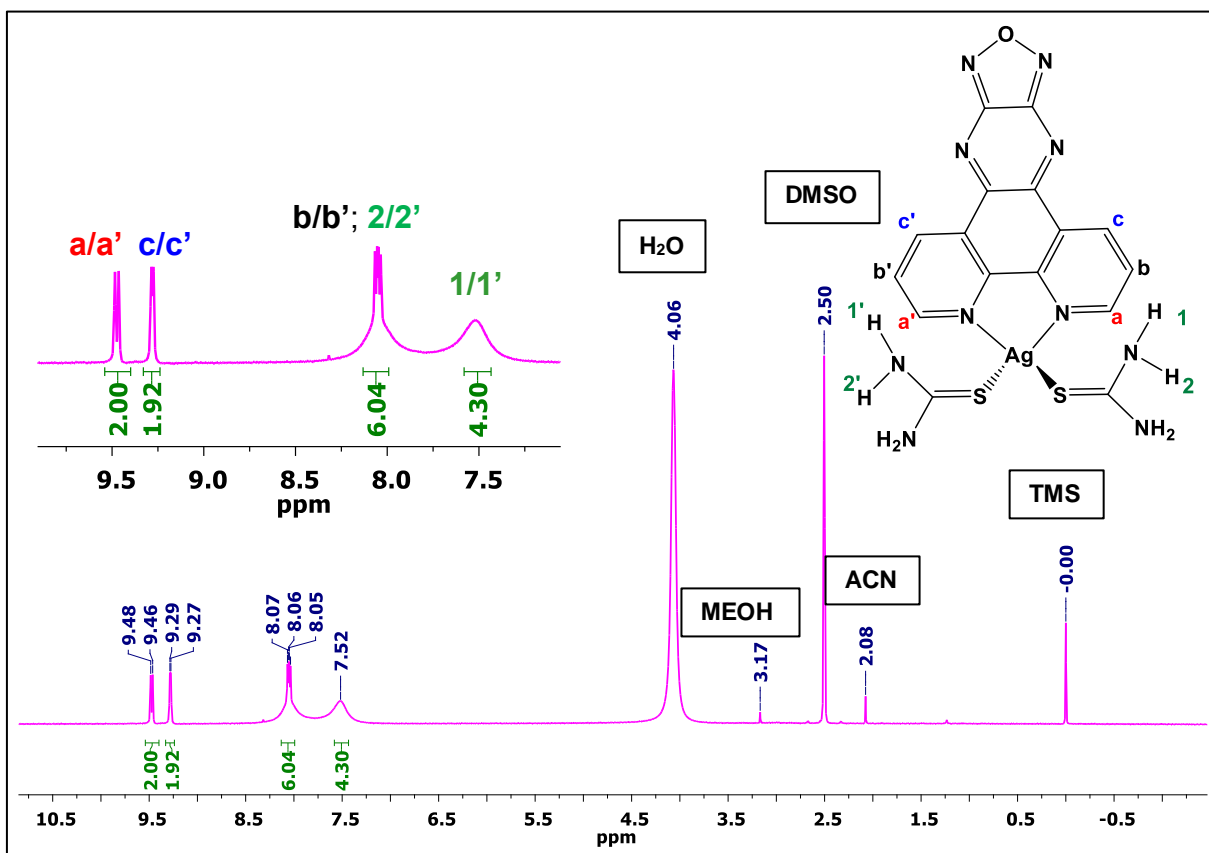
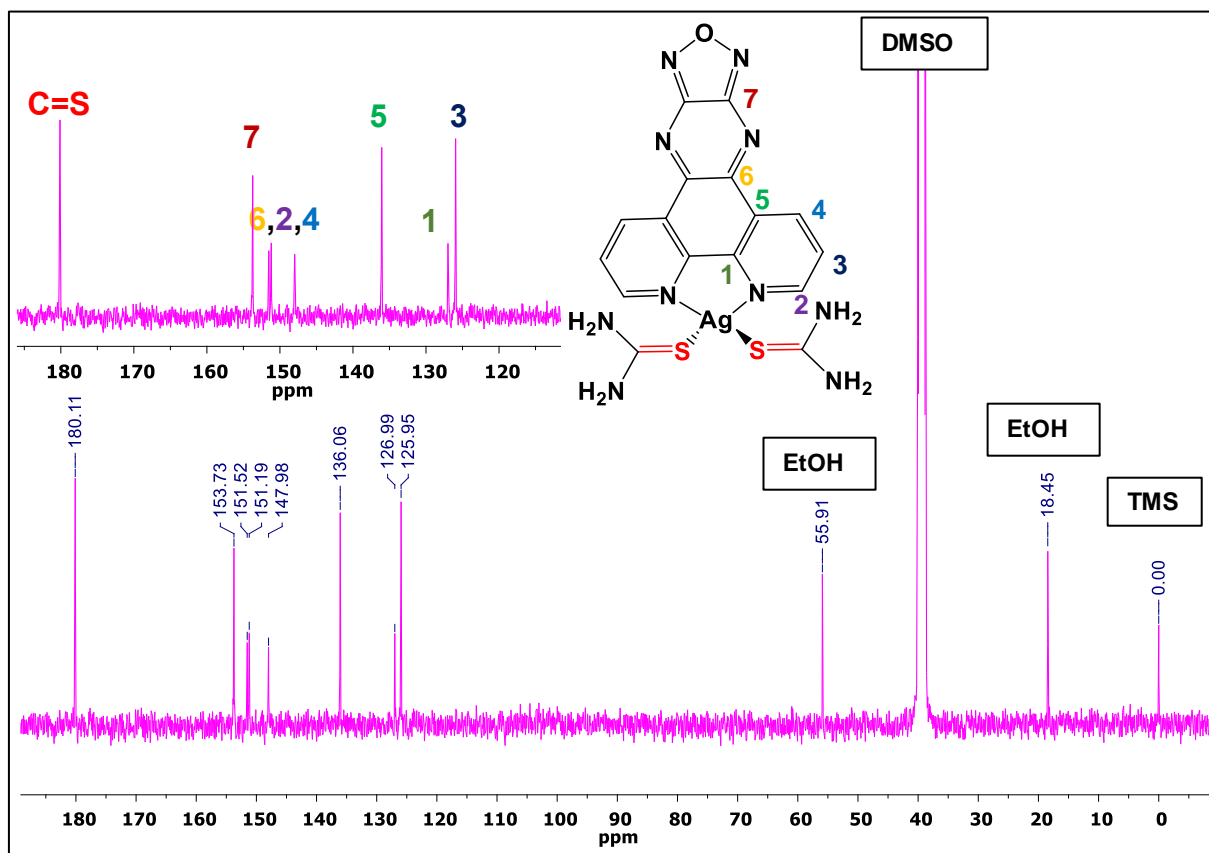


Figura 4.17. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]$ (**4**). Solvente: DMSO-d_6 .



A partir do espectro da Fig. 4.17, foi possível evidenciar os sinais de carbono dos anéis aromáticos, sendo observados sete sinais referentes a quatorze carbonos, devido a sua simetria C_{2v} . Notam-se efeitos de blindagem similares aos prótons, sendo os carbonos mais desprotegidos aqueles ligados próximos aos nitrogênios eletronegativos (C2, 151,19 ppm, C6, 151,52 ppm e C7, 153,73 ppm). Além da presença do carbono quaternário C=S da tiouréia ocorrendo em 180,11 ppm.

Para o complexo (**5**), os espectros de hidrogênio e carbono, Fig. 4.18-19, respectivamente, foram consistentes com uma possível estrutura dimérica, apresentando razão das integrais entre os sinais dos H aromáticos e da tiouréia de 1:1. Vale destacar a presença dos oito sinais de carbonos aromáticos do complexo, incluindo o carbono ligado ao enxofre do coligante tioaminico.

A tabela 4.4 resume os deslocamentos químicos tanto para os hidrogênios quanto para os carbonos dos complexos **1-5**, assim como, seus desdobramentos e conseqüentemente constantes de acoplamento para aqueles que foram possíveis a determinação e valores de integrais.

Figura 4.18. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Ag}_2(\text{CN-L}_5)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**5**). Solvente: DMSO-d_6 .

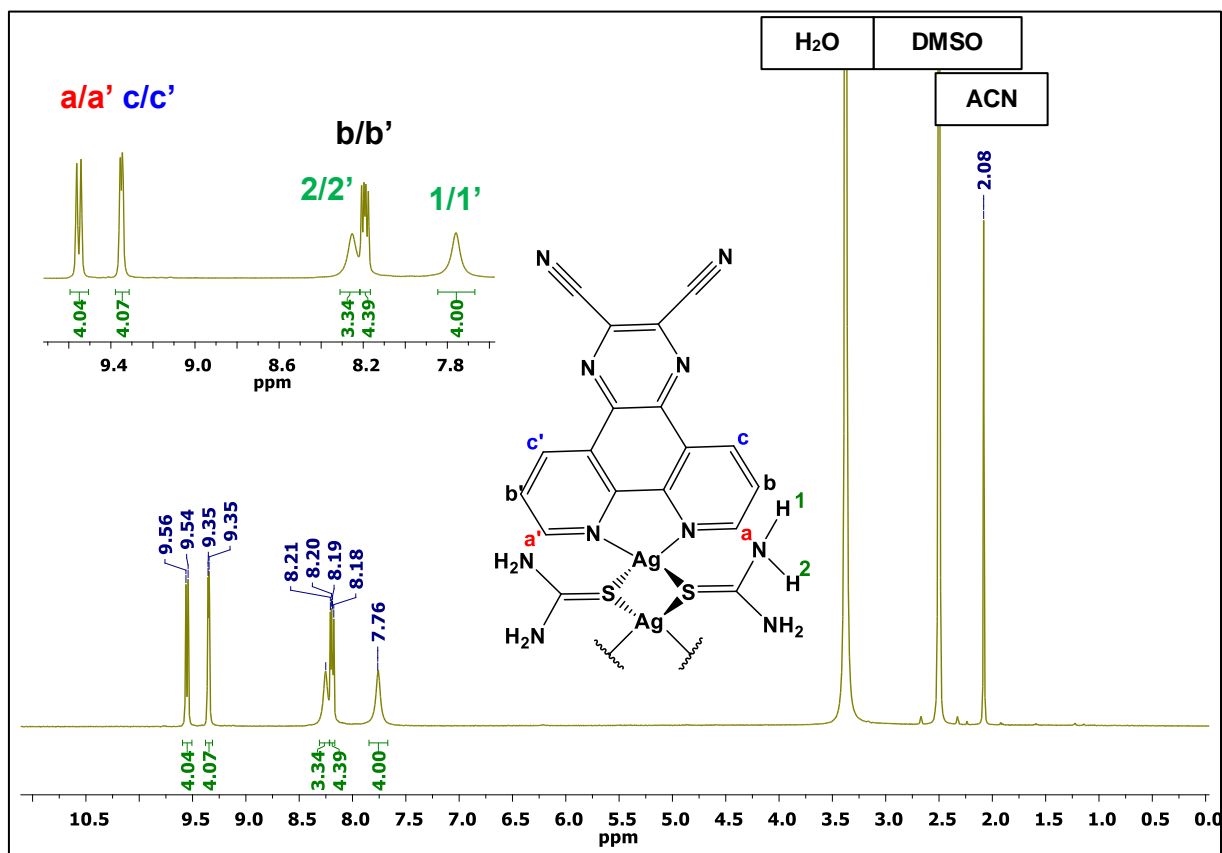


Figura 4.19. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ag}_2(\text{CN-L}_5)_2(\mu\text{-tu})_2]$ (**5**). Solvente: DMSO-d_6 .

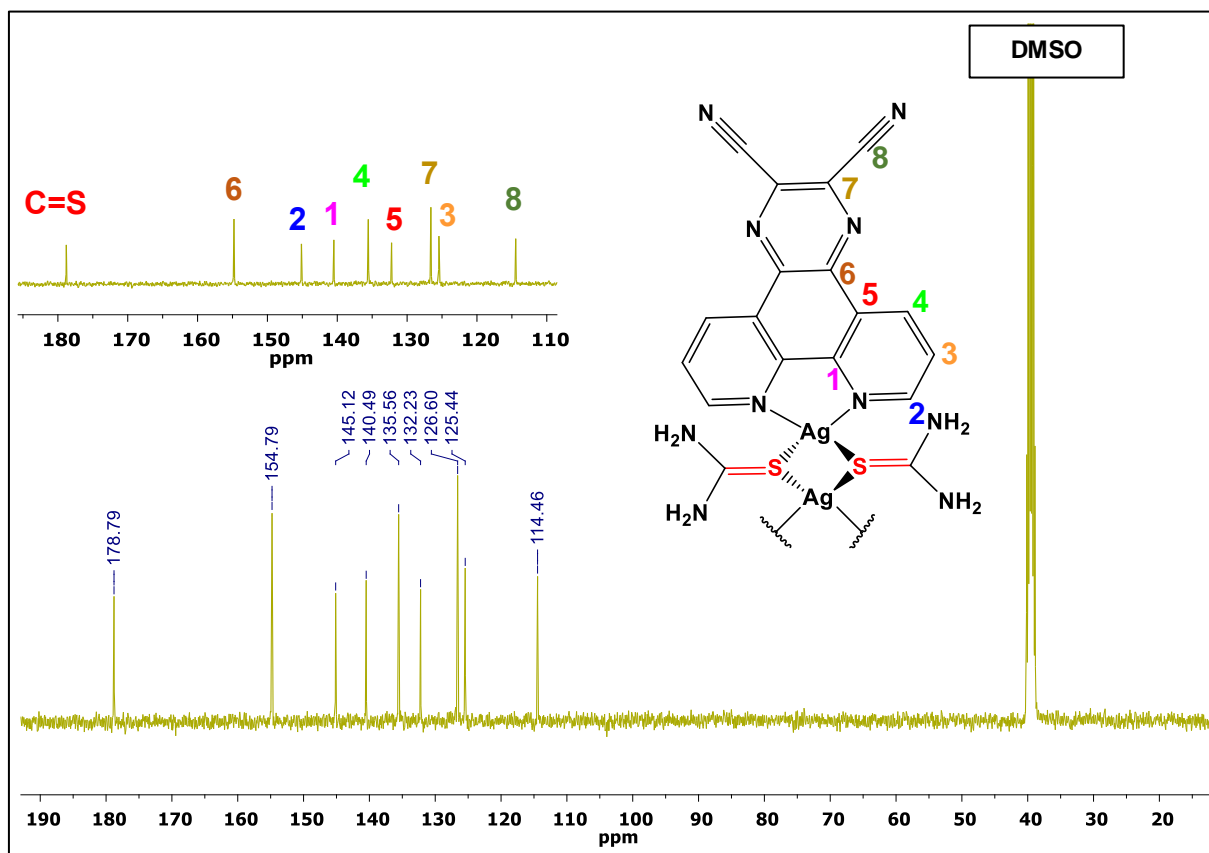


Tabela 4.4. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para os complexos de prata (I).

^1H	AgCH_3tu (1)	AgCltu (2)	AgNO_2tu (3)	AgNONtu (4)	AgCNTu (5)
<i>a/a'</i>	9,50	9,38	9,43 (t, 4H)	9,47 (d, $J= 8,0$ Hz, 2H)	9,55 (d, $J= 8,1$ Hz, 4H)
<i>b/b'</i>	n.d.	n.d.	8,03 (s, 4H)	8,05 (dd, $J= 8,0, 4,4$ Hz, 2H)	8,19 (dd, $J= 8,1, 4,2$ Hz, 4H)
<i>c/c'</i>	9,18	9,16	9,18 (s, 4H)	9,28 (d, $J= 4,4, 2$ H)	9,35 (d, $J= 4,2$ Hz, 4H)
<i>d</i>	n.d.	n.d.	8,98 (s, 2H)	-	-
<i>e</i>	n.d.	n.d.	8,63 (d, $J= 9,2$ Hz, 2H)	-	-
<i>f</i>	n.d.	n.d.	8,45 (d, $J= 9,2$ Hz, 2H)	-	-

¹³ C	AgCH ₃ tu (1)	AgCltu (2)	AgNO ₂ tu (3)	AgNONtu (4)	AgCNTu (5)
CH₃	21,63	-	-	-	-
C1	n.d.	131,04	-	126,99	140,49
C2	n.d.	153,01	-	151,19	145,12
C3	n.d.	125,35	-	125,95	125,44
C4	n.d.	135,99	-	147,98	135,56
C5	n.d.	132,17	-	136,06	132,23
C6	n.d.	146,21	-	151,52	154,79
C7	n.d.	141,03	-	153,73	126,60
C8	n.d.	127,04	-	-	114,46
C9	n.d.	140,32	-	-	-
C10	n.d.	134,01	-	-	-
11	n.d.	127,69	-	-	-
12	n.d.	140,59	-	-	-
13	n.d.	141,82	-	-	-
C=S	179,59	179,39	-	180,11	178,79

t= tripleto; **dd**= duplo dubleto; **d**= dubleto; **s**= singleto; **n.d.**= não identificado.

4.1.4. Análise elementar e Condutividade molar

Pela técnica de análise elementar, comparando os valores teóricos e experimentais, com exceção do complexo (4), foi possível evidenciar a possível formação de complexos bimetálicos com duas tiouréias realizando pontes entre os dois íons de prata (tabela 4.5). Vale destacar, que o RMN de próton para os complexos (3) e (5) indicam a formação dessas formas diméricas, quando a razão entre as integrais dos sinais dos hidrogênios equivalentes da fenantrolina e os hidrogênios da tiouréia foi 1:1. Já os complexos (1) e (2) não apresentaram resolução suficiente que permitisse uma análise mais detalhada. Para o complexo (4) a estrutura monometálica $[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ foi observada. Novamente, destaca-se a concordância com os dados obtidos pela técnica de RMN de ^1H .

Pela análise de condutividade molar, os compostos se apresentam como eletrólitos. O solvente utilizado foi o DMF, pois dentre os solventes possíveis, esse apresenta a melhor janela de análise, $37\text{-}122 \mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ em eletrólitos 1:1 e $90\text{-}192 \text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ em 2:1⁷⁴. Os dados obtidos mostram concordâncias nas razões eletrolíticas, para aqueles compostos que são dímeros 1-3 e 5, os valores de condutividades molares estão dentro das razões 2:1 ($2\text{NO}_3^- : [\text{Complexo}]^{2+}$). Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Análise elementar para os complexos de prata (I), seguidos de suas condutividades em DMF.

Complexo	C% exp (teóri.)	H% exp (teóri.)	N% exp (teóri.)	($\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$) (¹)
$[\text{Ag}_2(\text{CH}_3\text{-L}_1)_2(\mu\text{-tu})_2].2\text{NO}_3$ (1)	44,52 (44,29)	3,01 (2,97)	17,65 (18,08)	160,3
$[\text{Ag}_2(\text{Cl-L}_2)_2(\mu\text{-tu})_2]2\text{NO}_3.3 \text{H}_2\text{O}$ (2)	38,74 (38,70)	2,55 (2,73)	17,11 (16,63)	163,6
$[\text{Ag}_2(\text{NO}_2\text{-L}_3)_2(\mu\text{-tu})_2].2\text{NO}_3.3\text{CH}_3\text{CN}$ (3)	41,62 (42,93)	2,78 (2,51)	20,96 (19,31)	160,2
$[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]\text{NO}_3.2 \text{H}_2\text{O}$ (4)	30,59 (30,39)	2,42 (2,87)	23,21 (24,36)	114,4
$[\text{Ag}_2(\text{CN-L}_5)_2(\mu\text{-tu})_2].2\text{NO}_3.3\text{H}_2\text{O}$ (5)	36,76 (36,77)	2,36 (2,36)	22,92 (22,70)	167,2

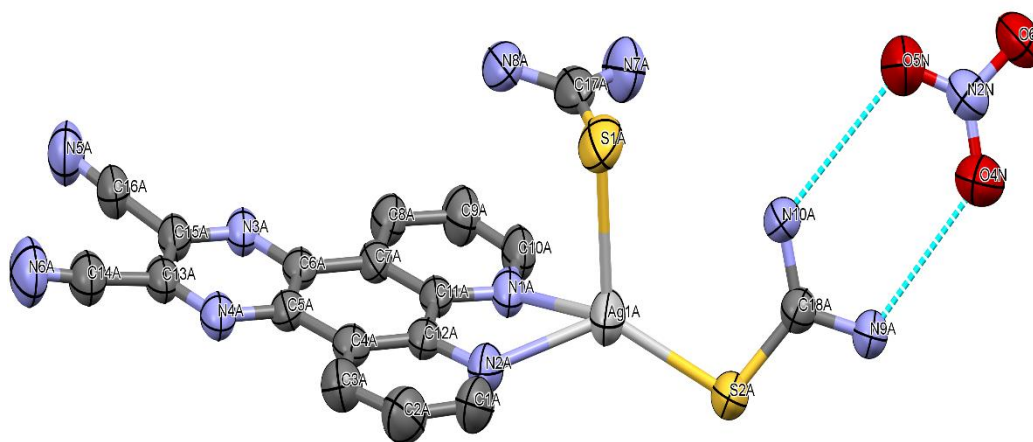
4.1.5. Descrição do cristal obtido para o complexo $[\text{Ag}(\text{CN-L}_5)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ (**5**)

Os cristais do complexo (**5**) foram obtidos por evaporação espontânea do solvente utilizado no meio reacional. A cristalização ocorreu com a formação de uma estrutura monometálica, contrastando com os dados espectroscópicos, análise elementar e condutividade molar. No entanto, entende-se que as condições de obtenção do pó e dos cristais foram completamente diferentes, o que poderia justificar a discrepância entre os dados experimentais, algo que é comum na literatura⁴⁹, principalmente envolvendo complexos de prata, que possuem essa versatilidade estrutural acentuada.

A estrutura determinada mostra o íon prata em uma geometria tetraédrica distorcida, coordenada ao ligante quelato e duas tiouréias. Observa-se o íon nitrato atuando como contra íon, assim como ligações de hidrogênios entre os oxigênios do ânion e os hidrogênios de um dos coligantes. (Fig. 4.20). Essa distorção fica bastante evidenciada nas distâncias de ligações entre o metal e os respectivos ligantes, onde nas ligações Ag-N tem-se distâncias de 2,409 Å e 2,436 Å e Ag-S essas ainda maiores com 2,638 Å e 2,434 Å. Os ângulos também mostram isso, com torções de 68° entre N1A-Ag-N2A, 116° S1A-Ag-S2A, além de ângulos entre metal e cada ligante de 130° N2A-Ag-S2A e 95° N1A-Ag-S1A.

A tabela com os dados cristalográficos assim como a célula unitária para o composto se encontra em apêndice (Tabela A1 e Fig. A11, respectivamente).

Figura 4.20. Estrutura de monocristal do complexo 5.



A tabela 4.6, resume os comprimentos de ligações e ângulos de ligações para o complexo.

Tabela 4.6. Ângulos e distancias de ligações para o complexo $[Ag(CN-L_5)(tu)_2].NO_3$ (5).

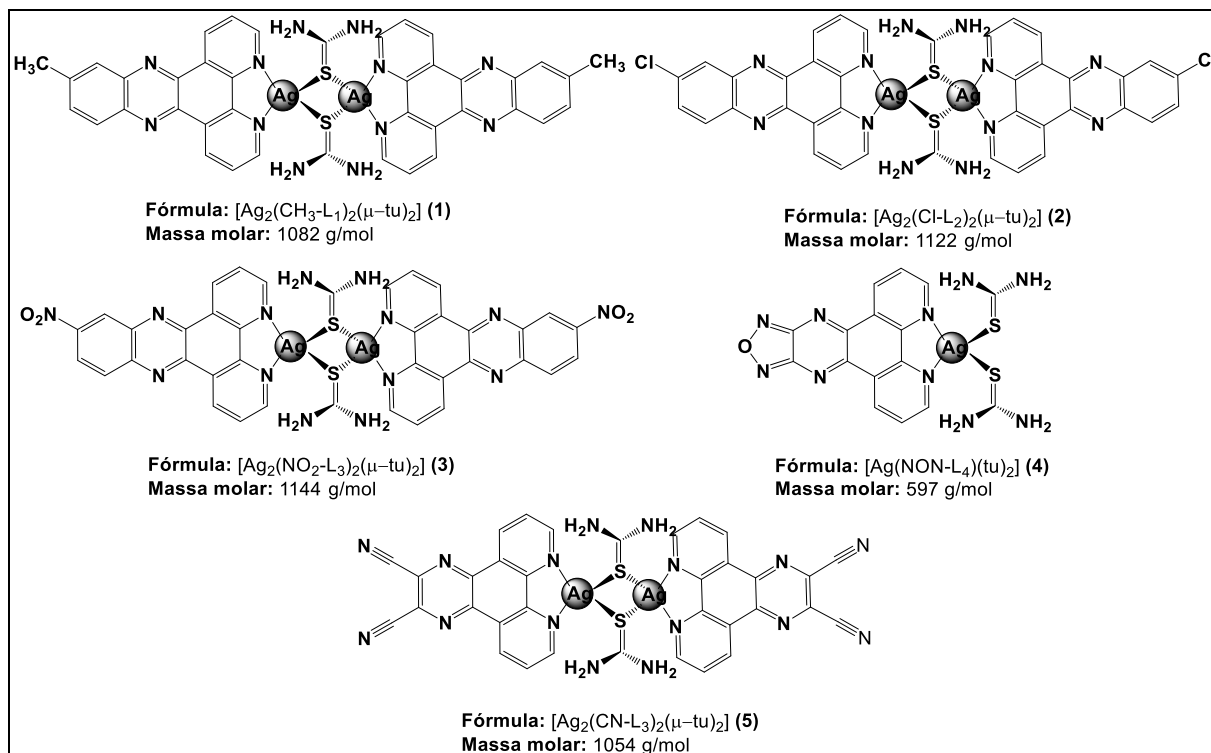
ÂNGULOS (°)	
N1A-Ag-N2A	68,28
S1A-Ag-S2A	116,54
N1A-Ag-S1A	94,66
N2A-Ag-S2A	130,01
DISTÂNCIA (Å)	
Ag-N1A	2,436
Ag-N2A	2,409
Ag-S1A	2,638
Ag-S2A	2,434

4.1.6. Proposta Estrutural

Diante do que foi exposto até o momento, passamos a assumir a formação tanto de complexos bimetálicos (1-3 e 5), quanto monometálico (4) (Fig. 4.21). Em resumo, foram evidenciados pelas técnicas de Ressonância magnética de próton e análise elementar uma grande concordância do que ocorre em solução e no estado sólido (pó). Embora os espectros de RMN 1H para os complexos (1) e (2) não apresentem condições adequadas para a determinação das integrais dos sinais, a técnica CHN demonstrou grande concordância nos valores para compostos bimetálicos, sendo o ligante tiouréia a ponte entre os dois centros. Já para os compostos (3) e (5) foi possível a determinação das integrais dos sinais de hidrogênio, pela técnica de RMN, como sendo de 1:1, assim como os dados de análise elementar que também condizem para a formação de dímeros. Vale destacar que para o complexo (5), a difração de raios X mostrou a formação do monocomplexo, mas como discutido no item anterior (4.1.5), a formação pode estar ligada ao seu modo de obtenção. Por fim, o complexo (4) apresentou dados de RMN e CHN condizentes com a formação de complexo mononuclear.

Partindo destas análises foram sugeridas as estruturas representadas na Figura 4.21. Diante disso, as análises seguintes respeitaram as massas moleculares das estruturas propostas.

Figura 4.21. Propostas estruturais dos complexos de prata, seguidos de suas respectivas massas.

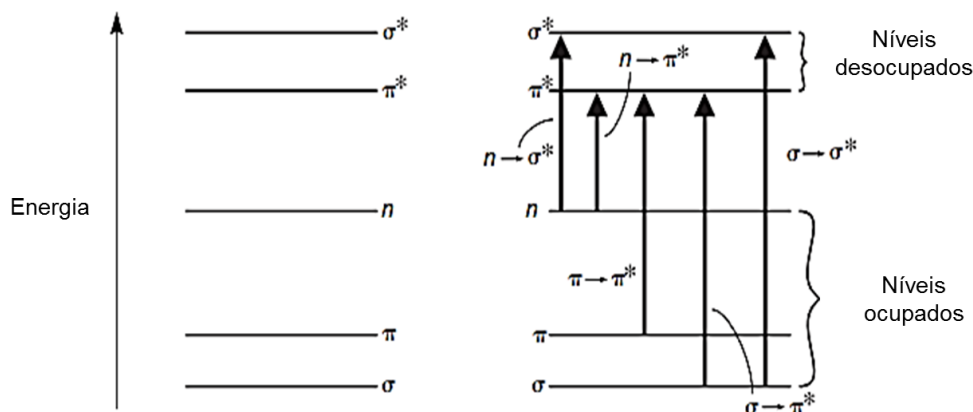


4.1.7. Espectrometria eletrônica na região do UV-Visível

Os espectros na região do ultravioleta visível foram obtidos utilizando soluções de DMSO. Os espectros foram sobrepostos com seus respectivos ligantes fenantrolínicos. Vale destacar que o coligante tiouréia absorve em regiões de altas energias⁷⁵, estando fora da janela estudada, tal como ocorre com o solvente.

Para todos os espectros observaram-se contribuições de bandas inteiramente dos ligantes policíclicos. Tais bandas são de caráter de transições intraligante, $\pi \rightarrow \pi^*$ em regiões de maiores energias entre 272-294 nm, e $n \rightarrow \pi^*$ nas regiões de 329-400 nm, entre os orbitais dos anéis aromáticos e os grupos substituintes. Fig. 4.22⁴⁵⁻⁴⁷.

Figura 4.22. Transições entre níveis energéticos possíveis em moléculas aromáticas⁷².



Foi possível observar um efeito hipercrômico quando se compara os espectros dos complexos com seus respectivos ligantes, Figuras 4.23-24. Este efeito indica a formação dos complexos, uma vez que a presença de espécies diméricas no sistema acarretam um aumento de grupos cromóforos, destaca-se, o hipercromismo nos espectros dos complexos **(1)**, **(2)**, **(3)** e **(5)**. O mesmo efeito é pouco observado no complexo **(4)**.

Como o metal se trata de um íon d^{10} , não se espera transições do tipo d-d, por conta do preenchimento total desses orbitais, transições do tipo metal ligante são esperadas, mas as mesmas podem ter poucas contribuições frente as intensidades das bandas pertencentes aos ligantes aromáticos.

Figura 4.23. Espectros UV-vis dos complexos sobrepostos com seus respectivos ligantes.

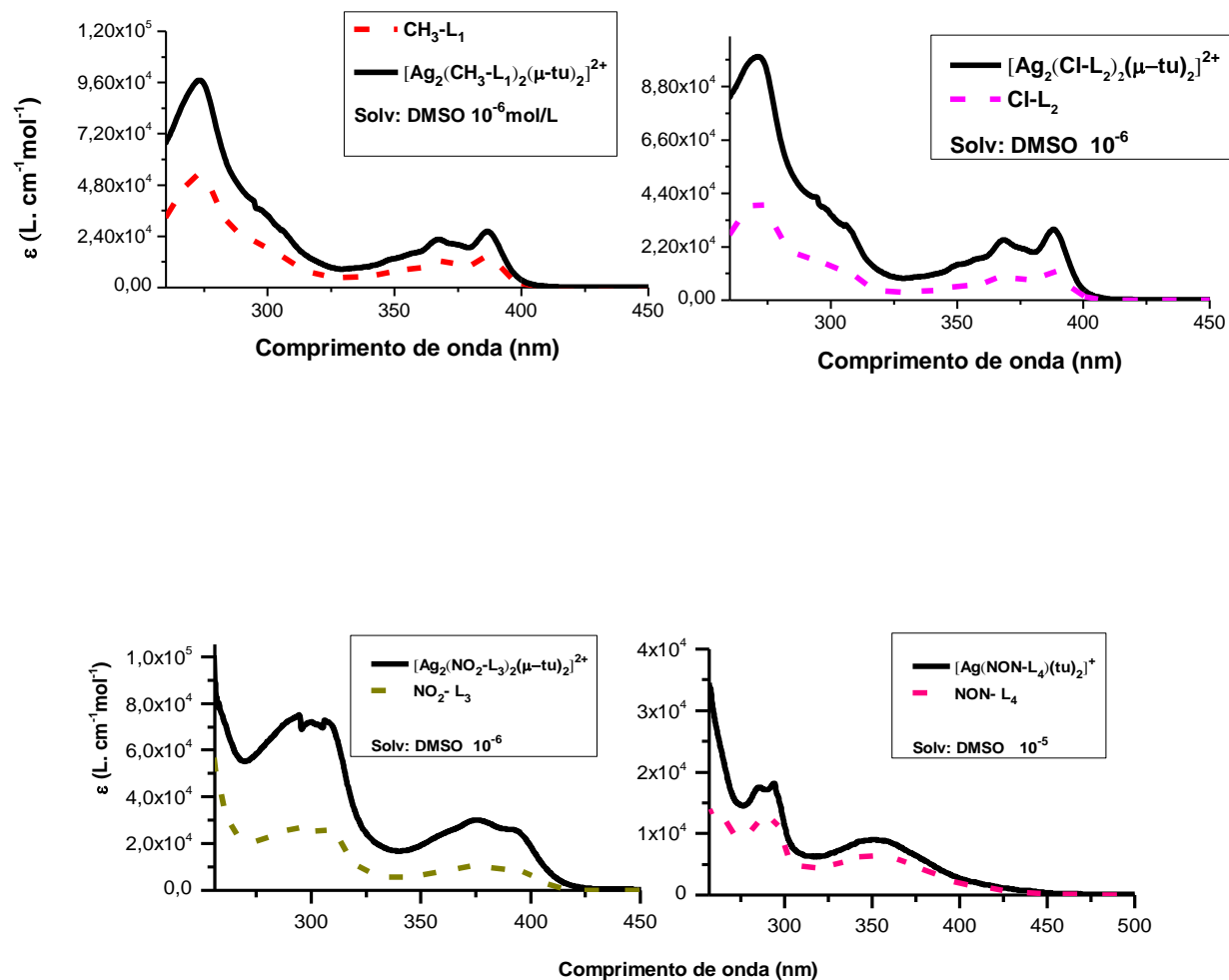
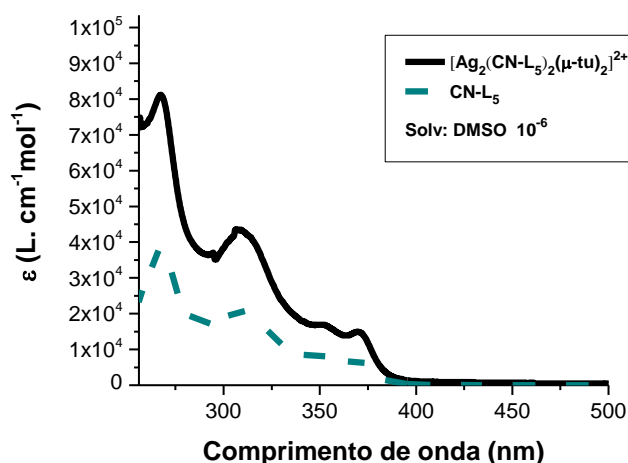


Figura 4.24. Espectros UV-vis para o complexo (5), sobreposto com seu respectivo ligante.



A tabela 4.7 apresenta a natureza das transições dos ligantes e complexos, assim como os comprimentos de ondas dos picos máximos de absorção, convertidos em absorvidade molar representado por ϵ :

Tabela 4.7. Principais bandas com suas absorvidades molares dos ligante e complexos na região do UV-Vis.

Ligantes/Complexos	Transição	(Comprimento de onda nm) ϵ (L. cm ⁻¹ mol ⁻¹ 10 ³)
CH ₃ -L ₁ / [Ag ₂ (CH ₃ -L ₁) ₂ (μ -tu) ₂]	$\pi \rightarrow \pi^*$	(273) 53 / 97
	$n \rightarrow \pi^*$	(367) 13 / 23
	$n \rightarrow \pi^*$	(386) 14 / 26
Cl-L ₂ / [Ag ₂ (Cl-L ₁) ₂ (μ -tu) ₂]	$\pi \rightarrow \pi^*$	(271) 40 / 99
	$n \rightarrow \pi^*$	(368) 9 / 25
	$n \rightarrow \pi^*$	(388) 12 / 29
NO ₂ -L ₃ / [Ag ₂ (NO ₂ -L ₁) ₂ (μ -tu) ₂]	$\pi \rightarrow \pi^*$	(294) 26 / 75
	$n \rightarrow \pi^*$	(375) 11 / 30
	$n \rightarrow \pi^*$	(392) 9 / 26
NON-L ₄ / [Ag ₂ (NON-L ₁)(tu) ₂]	$\pi \rightarrow \pi^*$	(285) 12 / 17
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(293) 12 / 18
	$n \rightarrow \pi^*$	(352) 6 / 9
CN-L ₅ / [Ag ₂ (CN-L ₅) ₂ (μ -tu) ₂]	$\pi \rightarrow \pi^*$	(267) 38 / 81
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(309) 21 / 43
	$n \rightarrow \pi^*$	(352) 8 / 17
	$n \rightarrow \pi^*$	(370) 7 / 15

4.1.8. Estabilidade em solução dos complexos

É importante verificar a estabilidade dos complexos em solução de DMSO, uma vez que é o solvente utilizado na solução “mãe” aplicada nos ensaios biológicos. Essa estabilidade pode ser aferida com o uso de técnicas usuais de laboratório, por exemplo, a técnica de UV-Vis que é muito sensível a qualquer mudança no sistema da molécula. Portanto, foram coletados espectros eletrônicos em três tempos distintos, 0, 24 e 48 horas (Fig 4.25-26). Destaca-se que 48 horas é o tempo máximo que os compostos ficam incubados com as linhagens celulares e biomoléculas.

Figura 4.25. Estabilidade via UV-Vis para os complexos (1), (2) e (3) em 0, 24 e 48 horas. Solvente: DMSO.

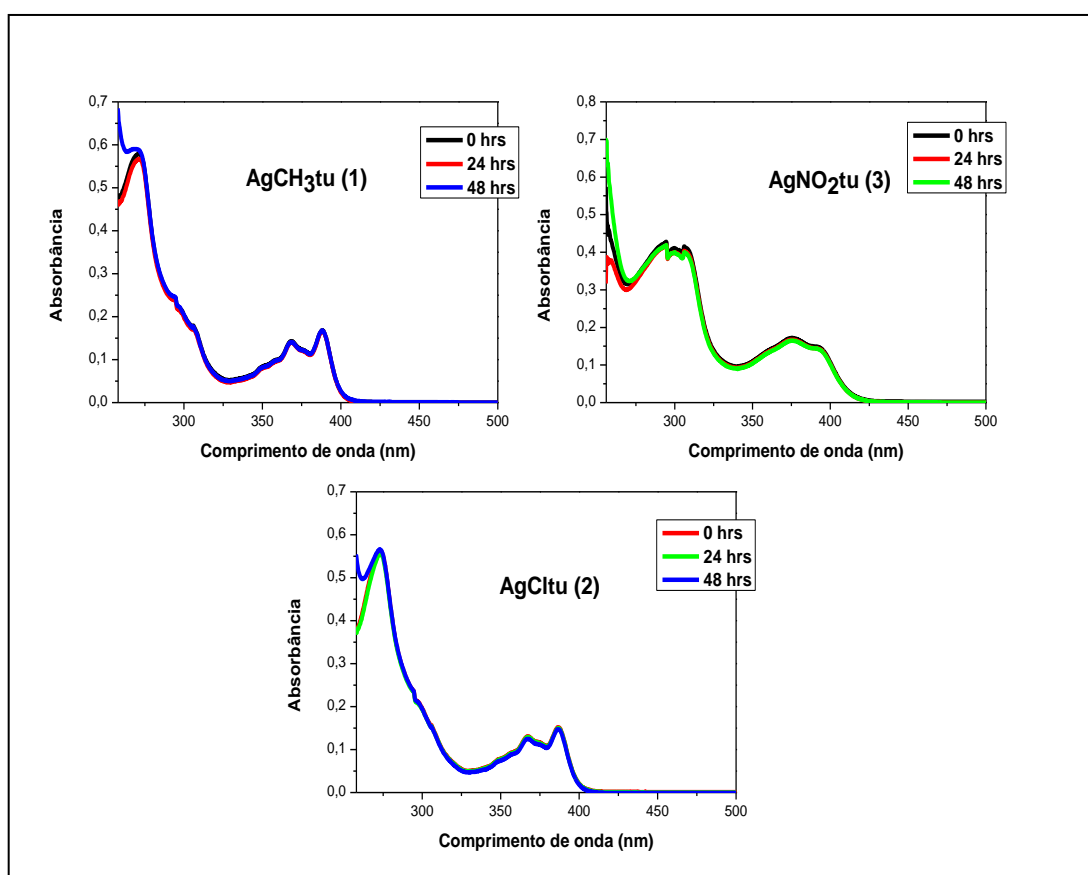
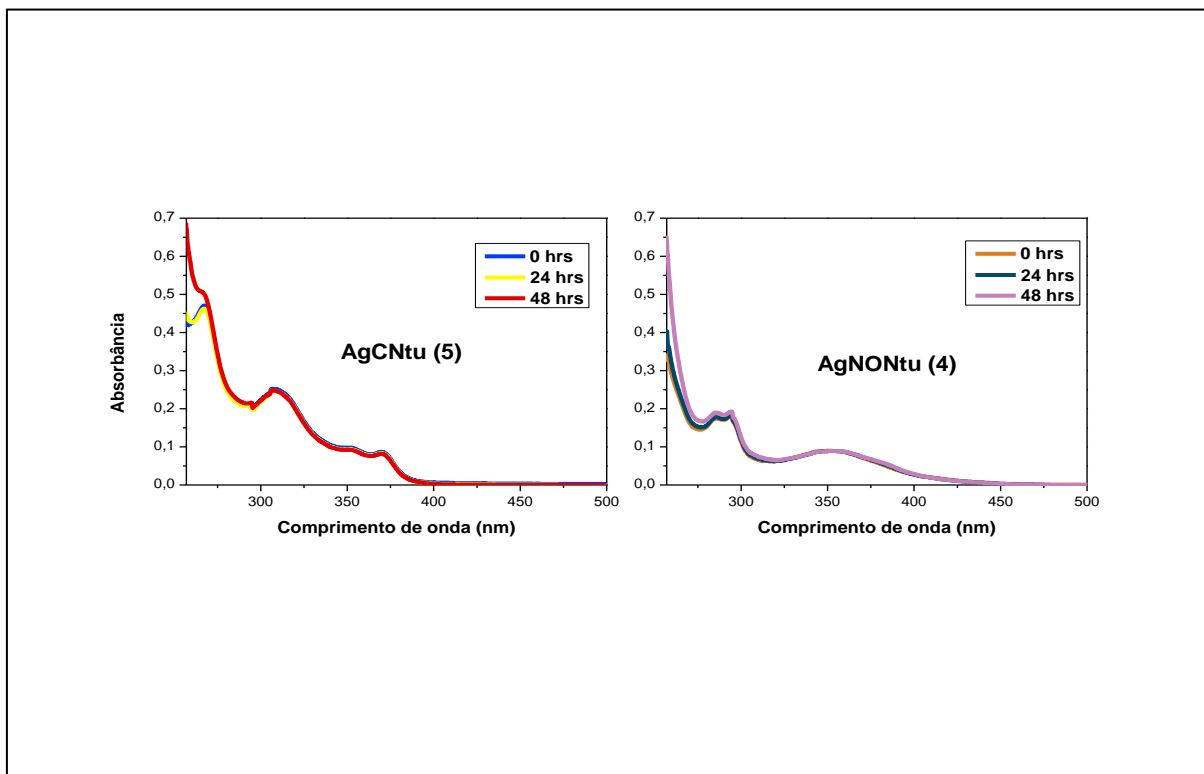


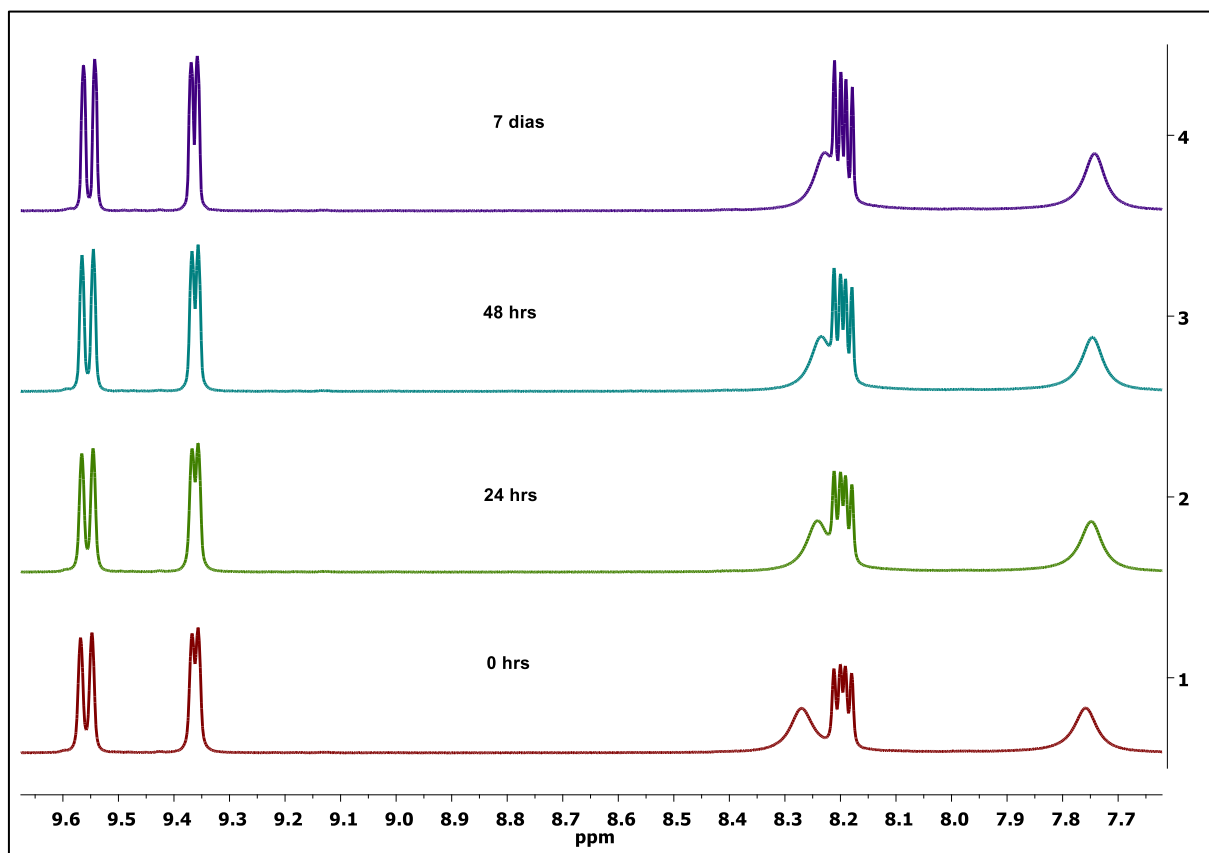
Figura 4.26. Estabilidade via UV-Vis para os complexos **(4)** e **(5)** em 0, 24 e 48 horas. Solvente: DMSO.



De maneira geral, nestas condições, nenhuma mudança significativa fora observada nos perfis das bandas nos espectros dos complexos, indicando uma estabilidade frente ao solvente. No entanto, foi possível observar pequenas alterações nas regiões de maiores energias, isso pode estar atrelado a interações entre solvente e soluto, uma vez que há a possibilidade de se estabelecer ligações de hidrogênio.

Adicionalmente, o complexo **(5)** foi submetido a análise de RMN de ^1H em diferentes intervalos de tempo (Fig. 4.27), no intuito de averiguar se alguma mudança no ambiente químico dos hidrogênios ocorreria após este período.

Figura 4.7. Estabilidade em solução via RMN de ^1H para o complexo **(5)**. Solvente: DMSO- d_6 .



No intervalo de tempo estudado, não se observou mudanças substanciais nos sinais dos hidrogênios da molécula, indicando assim, que os complexos são estáveis em solução de DMSO. Mais uma vez, ocorreram pequenas mudanças envolvendo sinais referentes aos hidrogênios das tiouréias, como descrito, isso pode estar vinculado a possíveis interações com o solvente e até mesmo provindas do contra íon nitrato em solução.

4.1.9. Coeficiente de partição dos complexos

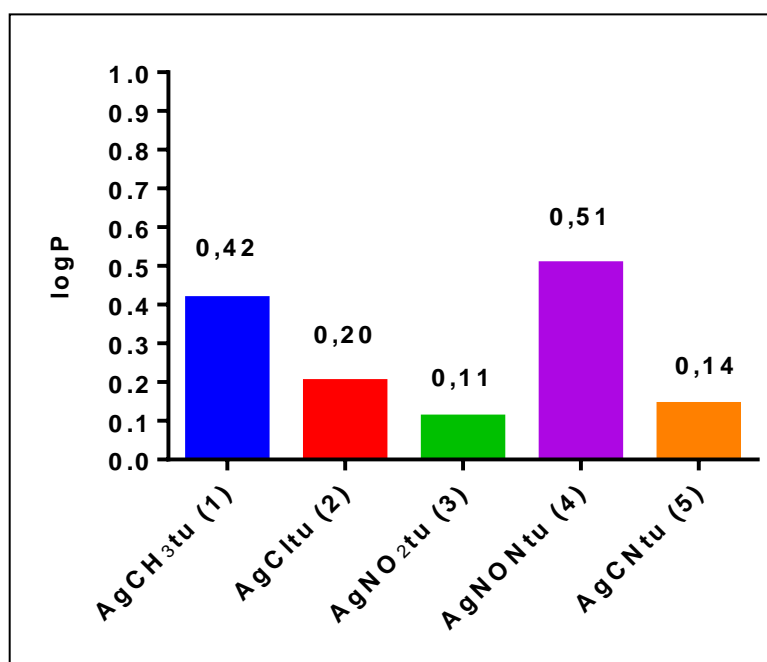
O coeficiente de partição é uma medida amplamente utilizada no meio farmacológico que visa determinar se certas substâncias têm propriedades lipofílicas, ou seja, adentrar na célula por meio das membranas fosfolípídicas. Para isso utilizam-se duas fases que simulam o meio biológico, e imiscíveis entre si, sendo água e n-octanol as mais comuns.

O n-octanol é um solvente orgânico oleoso que justamente por conta das suas propriedades químicas com cadeias hidrofóbicas e grupos hidrofílicos consegue simular o que se ocorre *in-situ*⁷⁶.

A determinação do coeficiente de partição é realizada com o auxílio da técnica de UV-Vis, a concentração na fase aquosa foi determinada pela diferença inicial e final da fase orgânica e aplicando a equação 1, exposta na metodologia⁷⁶. Como os valores se apresentam em uma faixa grande os dados são expressos em função logarítmica ($\log P$).

A Figura 4.28, expõe os resultados encontrados para a lipofilicidade de cada complexo, os espectros assim como as regressões lineares para os cálculos são mostrados no apêndice.

Figura 4.28. Gráfico em barras com valores de $\log P$ para os complexos.



De maneira geral os complexos se demonstraram lipofílicos apresentando valores positivos e próximos entre si. Tais valores podem permitir que os complexos adentrem nas células por meio das membranas fosfolipídicas⁷⁶. Para os complexos bimetálicos **(1-3)**, observa-se a influência dos substituintes presentes ao final da estrutura aromática, condizentes com a natureza desses grupos, sendo o complexo **(1)** o mais lipofílico. O complexo **(5)** apresenta baixa lipofilicidade em decorrência da presença de grupos nitrilas mais polares decorrentes do ligante heterocíclico. O composto **(4)**, apresentou o maior coeficiente de partição, 0,51, o que pode estar relacionado a sua estrutura monometálica.

5. Ensaio Biológicos e Interações com DNA.

5.1. Interações dos complexos frente ao DNA

5.1.1. Determinação de Kb por espectroscopia na região do UV-Vis

O uso da técnica de UV-Vis é uma das mais utilizadas para se investigar os tipos de interações que ocorrem entre a biomolécula de DNA e os compostos de interesse.

Os efeitos nas bandas dos complexos quando se varia as concentrações do DNA podem indicar como está ocorrendo às interações. Para um complexo intercalador esperam-se alguns efeitos: batocromismo (deslocamento para o vermelho) ocorre por conta de uma estabilidade adquirida, após a intercalação, provocando uma diminuição na energia necessária para as transições π ; hipocromismo (diminuição da intensidade das bandas), esse fenômeno ocorre justamente por conta das transições π para π^* (composto-DNA) serem limitadas, pois esses orbitais π já estão preenchidos por elétrons e conseqüentemente diminui-se a probabilidade dessas transições ocorrerem^{23,77}.

Além dos efeitos que os intercaladores podem provocar, outro parâmetro bastante usado é o cálculo da constante intrínseca de ligação (Kb), dado pela equação de Benesi-Hildebrand⁷⁸ (Eq. 3):

$$\frac{[\text{DNA}]}{\epsilon_A - \epsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad \text{Equação 3.}$$

Onde:

[DNA] = concentração adicionada do DNA;

ϵ_A = Abs/[complexo]

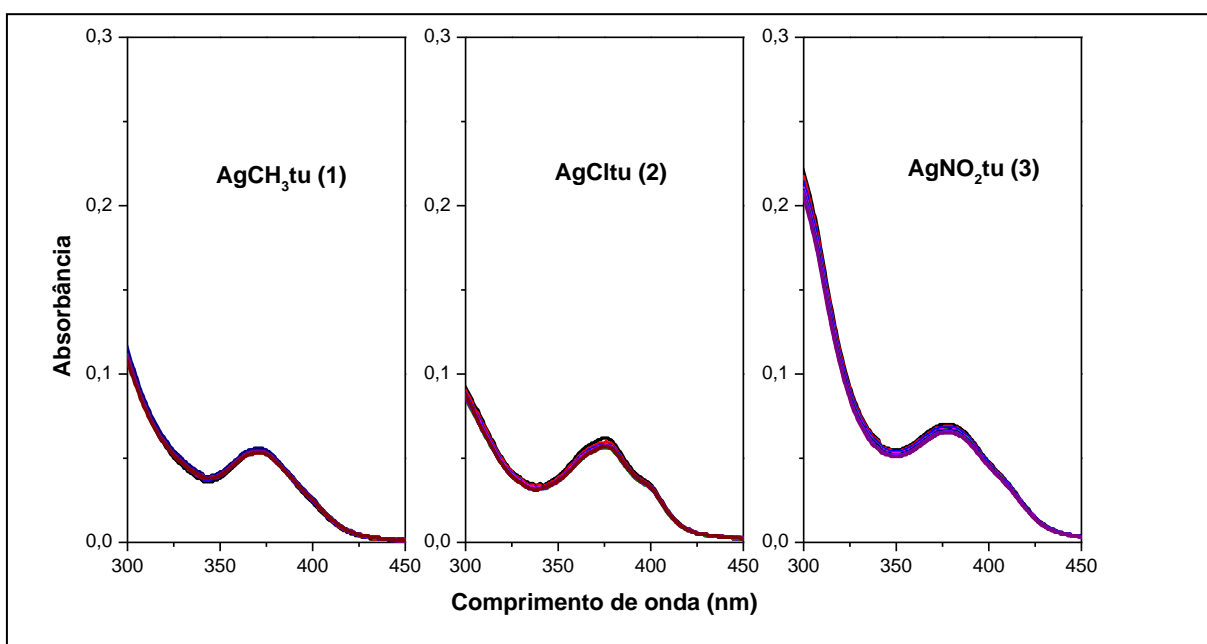
ϵ_f = coeficiente de absorvidade molar do complexo livre

ϵ_b = coeficiente de absorvidade do complexo-DNA.

Assim por meio da razão entre os coeficientes angular e linear de um gráfico $[\text{DNA}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ se tem a constante de Kb. A partir do valor obtido é possível realizar uma associação a algum tipo de interação.

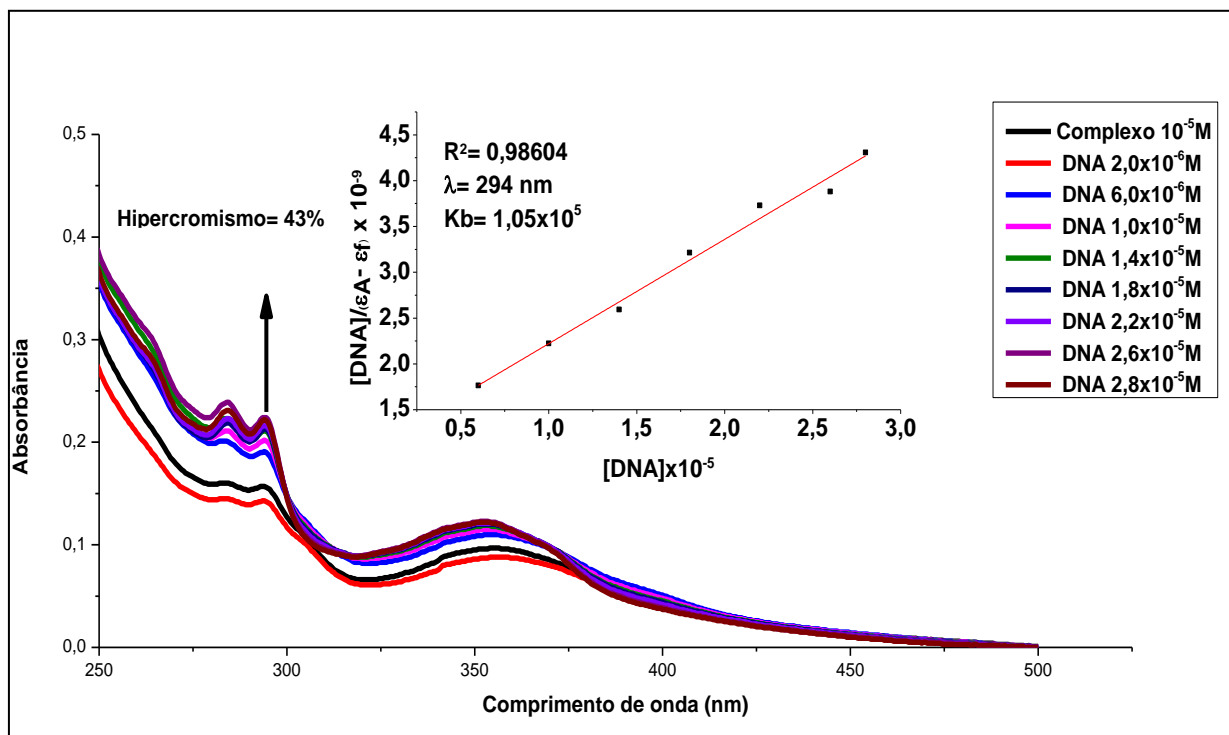
Os espectros de UV-Vis com incrementos de DNA dos complexos **1-3** são mostrados na Fig. 4.29. Foi possível observar pelo perfil dos espectros que os complexos não demonstraram qualquer tipo de interação com a molécula de DNA, nas condições deste ensaio. As bandas acompanhadas foram em torno de 350-400 nm, que estão relacionadas as transições pertencentes aos sistemas aromáticos, que teoricamente sofreriam as maiores mudanças após uma interação com o DNA, uma vez que são justamente a porção da molécula com capacidade para intercalação. Possivelmente a extensão do ligante nestes complexos, por conta dos substituintes, pode ter prejudicado a inserção da parte dos anéis fenantrolínicos, com maior densidade eletrônica π , entre as bases nitrogenadas. Uma vez que não se observou a interação entre as moléculas, não foi possível calcular o valor de K_b .

Figura 4.29. Interação com o DNA via UV-Vis para os complexos (1), (2) e (3), respectivamente.



Os espectros de UV-Vis com incremento de CT-DNA dos complexos **(4)** e **(5)** são demonstrados nas Figuras 4.30-31, respectivamente.

Figura 4.30. Interação com o DNA vis UV-Vis para o complexo **(4)** em concentrações fixas e variações crescentes da concentração de CT-DNA, regressão linear e cálculo de Kb.



O complexo **(4)**, (Fig. 4.30), mostrou ter interações frente ao DNA, a primeira adição da solução da biomolécula a solução do complexo provocou uma diminuição significativa na intensidade das bandas do complexo, isso pode estar atrelado a alguma mudança conformacional causada pela interação entre composto e o DNA. No entanto, as adições sucessivas de CT-DNA causaram um aumento na intensidade das bandas, caracterizando um forte hiper cromismo de 43 %, além de um deslocamento para o azul (hipsocromismo) de 4 nanômetros que está dentro do erro exibido pela técnica utilizada. Diante dessas mudanças algumas considerações podem ser feitas: esses efeitos são característicos de interações ao sulco menor do DNA, por meio de interações de van der Waals e ligações de hidrogênio, que são propícios em anéis aromáticos com grupos furanos e pirrólicos⁷⁹, além do mais, efeitos eletrostáticos podem mudar a conformação das moléculas permitindo um aumento na intensidade das bandas⁸⁰. O valor de Kb, constante de interação, para a espécie complexo-DNA formada, é um parâmetro importante para se determinar a força de interação existente. O valor determinado para o complexo **4**-DNA foi de $1,05 \times 10^5$, indicando uma

interação intermediária quando comparada a um intercalador clássico, brometo de etídio, que apresenta uma constante na ordem de $1,40 \times 10^6$ ⁷⁷.

Para o complexo **(5)** (Fig. 4.31), efeitos contrários foram observados: hipocromismo (diminuição da intensidade) de 11% que é a provindas das transições π referentes ao ligante poliaromático no complexo, este efeito ocorre por conta da proximidade entre os orbitais do complexo com os orbitais da biomolécula. Um valor de $K_b = 7,66 \times 10^4$, foi determinado, caracterizando a interação como moderada. Alguns trabalhos encontrados na literatura com sistemas parecidos com o complexo **(5)** reportam efeitos hipocrômicos entre 18 à 45 % e constantes de ligações na ordem 10^3 à 10^5 , sendo considerados possíveis intercaladores frente ao DNA, com isso conclui-se que o composto também exibe interações com a biomolécula, sendo essas passíveis de interações eletrostáticas e intercalações intermediárias.

A tabela 4.8, compara constantes de ligações (K_b) encontradas para complexos ditos como intercaladores na literatura com os compostos aqui sintetizados, concluindo assim que os complexos **(4)** e **(5)** estão dentro do espectro de interações com o alvo desejado, assumindo uma força de interação moderada com o DNA.

Figura 4.31. Interação com o DNA vis UV-Vis para o complexo **(5)** em concentrações fixas e variações crescentes da concentração de CT-DNA, regressão linear e cálculo de K_b .

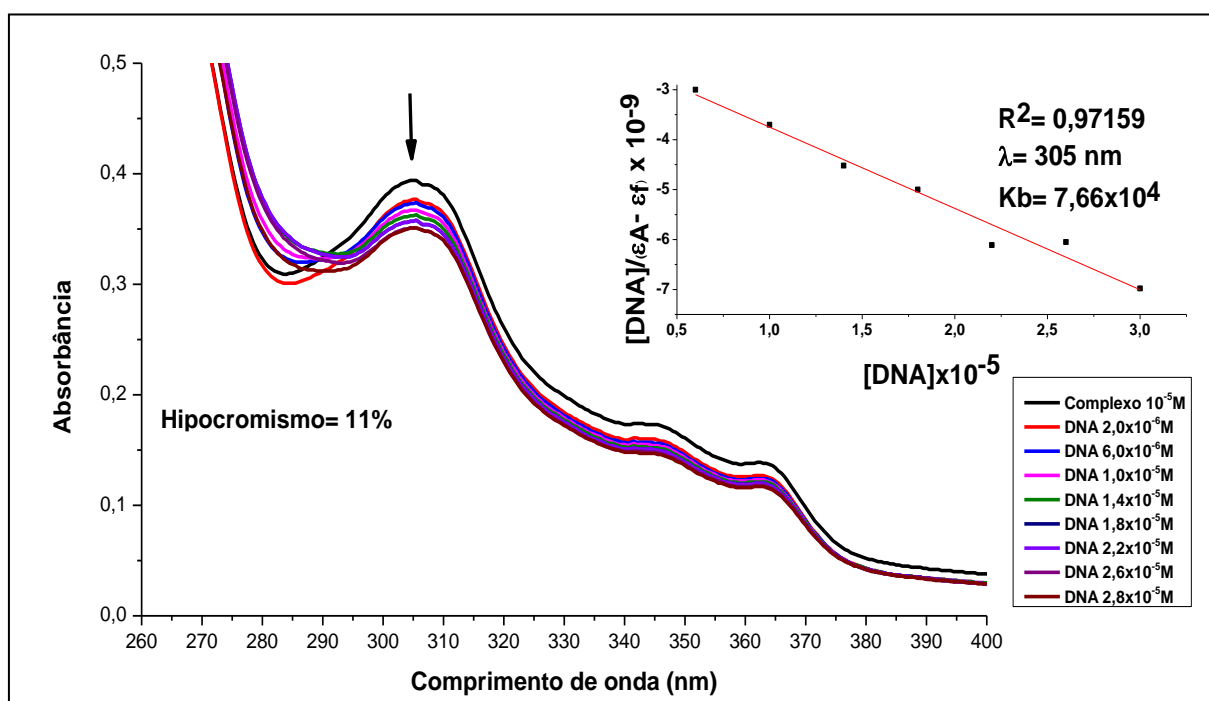


Tabela 4.8. Comparação dos complexos (4) e (5) com outros análogos na literatura utilizando a técnica de interação com o CT-DNA via UV-Vis.

Composto	Referências	Kb M ⁻¹	Deslocamento (nm) (azul* ou vermelho)	Hiper* ou Hipocromismo %
[Ag(NON-L ₄)(tu) ₂] ⁺ (4)	-	1,05x10 ⁵	4*	43*
[Ag(CN-L ₅)(tu)] ⁺ (5)	-	7,66x10 ⁴	1	11
dicqn	Sastri e col. ²⁵	1,70x10 ⁵	5	18
[Pt(dicqn)(bipy)] ²⁺	Ufuk e col. ⁶⁴	8,20x10 ⁵	1	18
[Mn(dicqn)(H ₂ O) ₂ NO ₃] ⁺	Sastri e col. ²⁵	5,00x10 ⁵	6	24
[Co(dicqn)(phen) ₂] ³⁺	Sastri e col. ²⁵	6,00x10 ³	3	28
[Ni(dicqn)(phen) ₂] ²⁺	Sastri e col. ²⁵	2,10x10 ⁴	5	35
[Ru(dicqn)(phen) ₂] ²⁺	Chen e col. ²³	3,30x10 ⁵	4	16
[Ru(bpy) ₂ (dpoq)] ²⁺	Bin Peng e col. ²⁶	6,05x10 ⁵	0	18
[Ru(phen) ₂ (dpoq)] ²⁺	Bin Peng e col. ²⁶	7,22x10 ⁵	0	21
[Pd(phen)(tu) ₂] ²⁺	Barra e col. ³⁶	8,6x10 ⁴	2	45
[Ag(daf)(phen)] ⁺	Movahedi e col. ³⁹	3,37x10 ⁵	-	-
BET	Afradi e col. ⁸¹	1,40x10 ⁶	-	-

5.1.2. Dicroísmo Circular (CD)

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica que tem ampla aplicação em estudos envolvendo interações com o DNA, através da técnica é possível identificar mudanças em uma estrutura molecular complexa, tais como: proteínas, polipeptídeos e o próprio DNA. Trata-se de um método bastante sensível, de resposta rápida e de baixo custo⁸².

O espectro do CT-DNA consiste em duas bandas, uma banda positiva em torno de 277 nm e uma negativa em 243 nm, sendo a primeira devido aos empilhamentos das bases nitrogenadas da biomolécula e a segunda característica da helicidade do DNA. Desta forma, qualquer interação que cause mudanças conformacionais provinda de agentes externos refletiria em uma alteração no perfil dessas bandas no espectro.

As Figuras 4.32-34 mostram os espectros de CD para o CT-DNA na presença de concentrações crescentes dos complexos AgNO_2tu **(3)**, AgNONtu **(4)** e AgCNTu **(5)**, respectivamente. Cada um destes compostos apresentou um padrão de interação diferente com o DNA quando analisados os espectros de UV-Vis, sendo o complexo **(3)** inativo, **(4)** possivelmente interage pelos sulcos e **(5)**, foram observadas características de um intercalador moderado.

Figura 4.32. Espectro CD do CT-DNA em concentrações crescentes do complexo **(3)**.

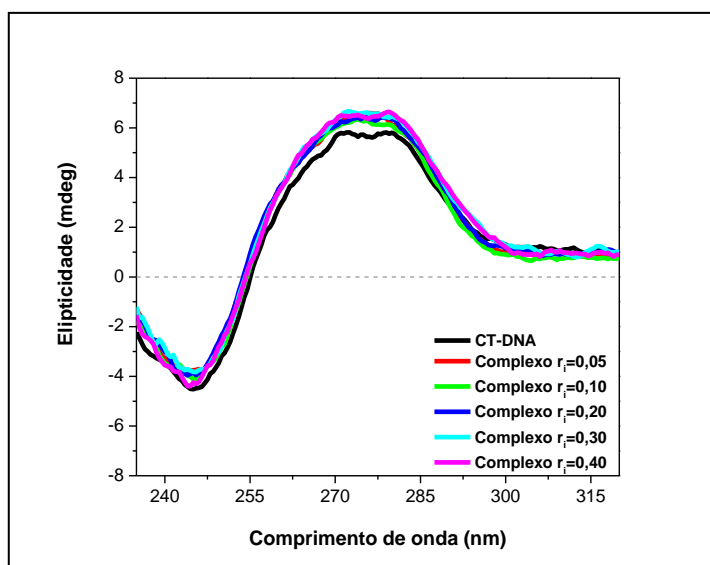


Figura 4.33. Espectro CD do CT-DNA em concentrações crescentes do complexo **(4)**.

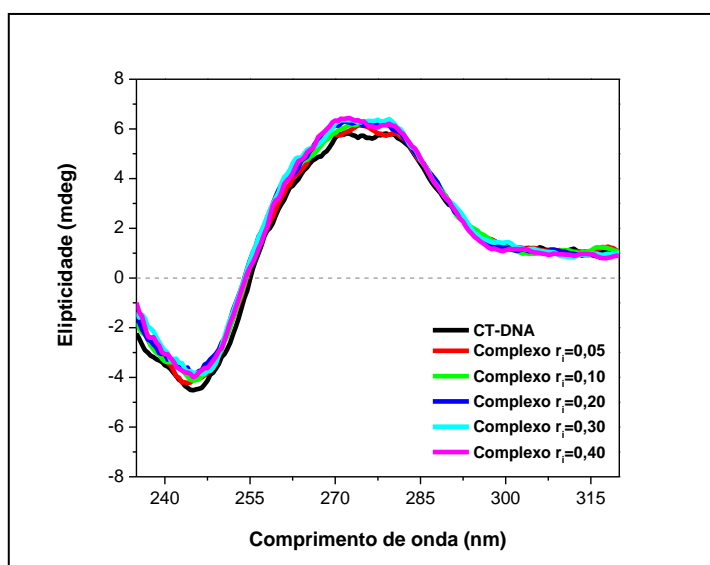
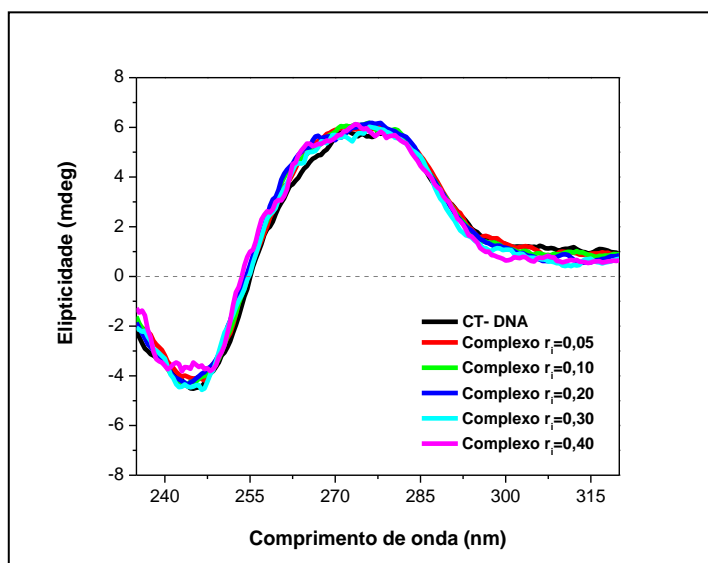


Figura 4.34. Espectro CD do CT-DNA em concentrações crescentes do complexo (5).



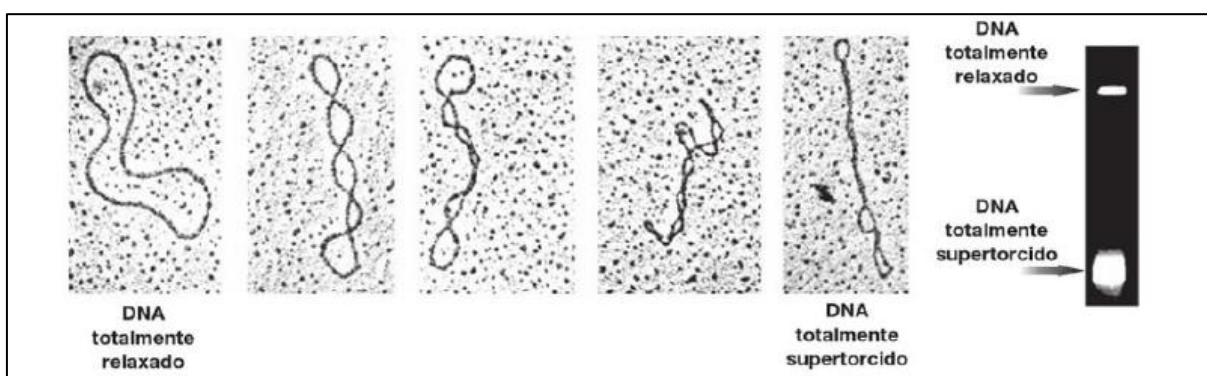
Os espectros acima mostram que não houveram mudanças consideráveis tanto na banda negativa como na positiva do CT-DNA, essas mudanças ocorrem, geralmente, quando se tem interações/ligações fortes, intercalação ou ligação covalente. Segundo Rehman e colaboradores⁸², quando ocorre pequenas mudanças ou nenhuma, que é o caso apresentado pelos nossos complexos, se ocorrer interação ela deve ser do tipo eletrostática ou nos sulcos.

Estes resultados demonstram a necessidade da realização de várias técnicas para se determinar o tipo de interação que pode estar ocorrendo entre a molécula de estudo e o DNA. Analisando os espectros das duas técnicas empregadas, em conjunto, é possível que ambos os compostos (4) e (5) estejam interagindo com a molécula de DNA pelos sulcos, uma vez que nenhuma alteração foi observada no espectro de CD e os valores de K_b são moderados. Outra possibilidade que pode justificar a falta de interação nos espectros de CD está relacionada com as condições do experimento, sendo necessário testar outra faixa de razão CT-DNA/compostos.

5.1.3. Interação com o DNA via eletroforese em gel

A eletroforese em gel é uma técnica que tem por finalidade observar as mudanças no deslocamento da(s) banda(s) do plasmídeo superenovelado do DNA após a interações com os compostos de interesse. O plasmideo de DNA pode assumir diferentes morfologias, e cada uma delas percorre uma distância singular no gel de agarose, dependendo de seu tamanho e formato, por exemplo: a banda pertencente a forma superenovelada (do inglês supercoiled-SC) tem uma maior facilidade em percorrer o gel, ou seja, uma migração maior por ser mais compacta em relação à forma circular (Open circular-OC), que é a conformação mais relaxada da biomolécula, essa relaxação pode acontecer a partir de uma intercalação ou ligação (Fig. 4.35).

Figura 4.35. Formas do plasmídeo de DNA visto por microscopia e corrida eletroforética nas formas OC e SC⁸³.



A fim de se verificar se os compostos são capazes de provocarem mudanças conformacionais no DNA, estes foram incubados com o plasmideo superenovelado em concentrações de 1, 10 e 100 μM . A Figura 4.36, apresenta os resultados obtidos após a corrida eletroforética. No gel, além dos compostos em diversas concentrações, observa-se um controle negativo, que é constituído somente pelo DNA. A Figura 4.37 apresenta o efeito da cisplatina, em diversas concentrações, na conformação plasmideal, sendo usado como controle positivo.

Figura 4.36. Investigação de diferentes concentrações dos complexos frente ao DNA plasmidal pBR322. Controle negativo = DNA + DMSO.

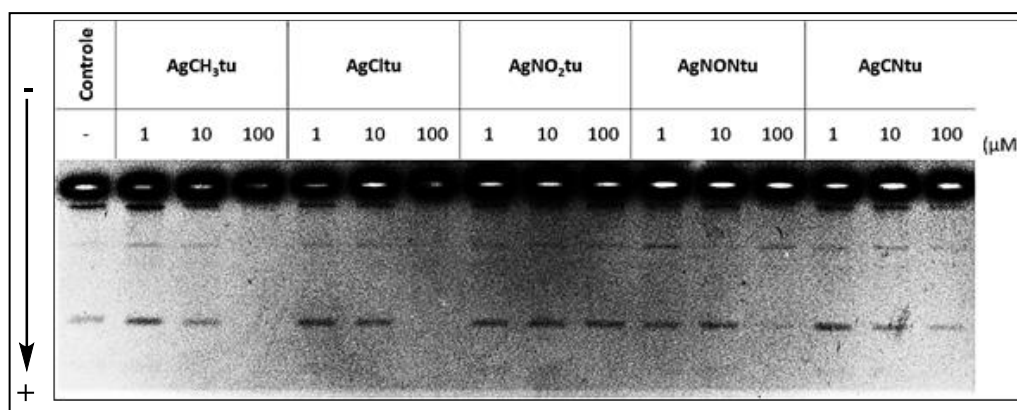
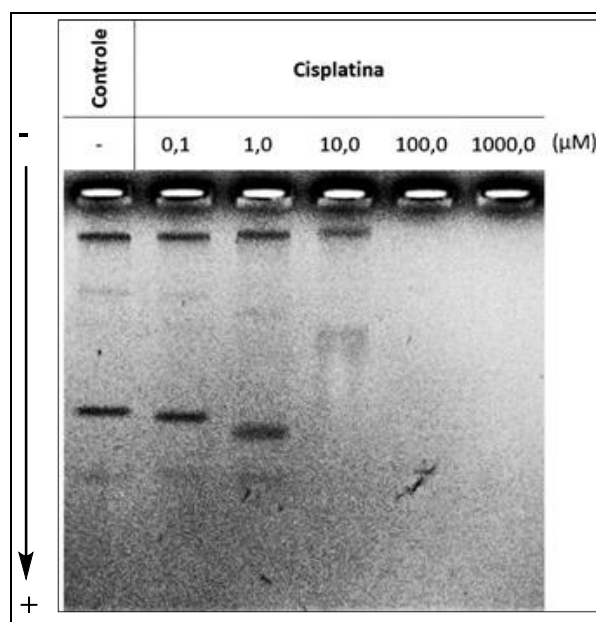


Figura 4.37. Investigação de diferentes concentrações da cisplatina frente ao DNA plasmidal pBR322. Controle negativo = DNA + DMSO.



Por se tratar de uma técnica menos sensível que as técnicas espectroscópicas, foi possível determinar interações dos complexos com o DNA somente em altas concentrações (100 μM). Tais observações leva a duas possibilidades: interação nos sulcos do DNA pode afetar o plasmídeo de forma que o corante utilizado, brometo de etídio, não marque a molécula danificada; a interação eletrostática em altas concentrações não permite que o plasmídeo se movimente pelo gel, devido sua alta densidade^{84,85}. No entanto, mais ensaios devem ser realizados para se determinar efetivamente o tipo de interação, tais como viscosidade, teste de fluorescência de deslocamento do brometo de etídio e ensaio de competição com um agente (Hoechst

33342) que interage no sulco menor. Por fim na Fig. 4.37, nota-se que a cisplatina a 1 μM começa a afetar a banda do DNA, e a 10 μM não é possível observar mais a banda, proveniente de uma clivagem total do plasmídeo, como relatado na literatura^{25,85}.

5.2. Determinação da atividade citotóxica.

Os ensaios citotóxicos foram realizados pelo método colorimétrico MTT. A Tabela 4.9 exibe os valores de IC_{50} (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular) frente as linhagens MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão), A2780cis (carcinoma de ovário resistente a cisplatina) e DU-145 (câncer de próstata) para os ligantes, complexos e a cisplatina.

Tabela 4.9. Valores de IC_{50} para ligantes e complexos.

Compostos	IC_{50} (μM)		
	MRC-5	A2780cis	DU-145
$\text{CH}_3\text{-L}_1$	-	>25	>25
Cl-L_2	>25	>25	>25
$\text{NO}_2\text{-L}_3$	>25	>25	>25
NON-L_4	0,26±0,012	0,24±0,004	1,88±0,100
CN-L_5	6,25±0,431	4,08±0,157	9,71±0,264
$[\text{Ag}_2(\text{CH}_3\text{-L}_1)_2(\mu\text{-tu})_2]2\text{NO}_3$ (1)	-	>25	>25
$[\text{Ag}_2(\text{Cl-L}_2)_2(\mu\text{-tu})_2]2\text{NO}_3$ (2)	-	11,7±0,531	>25
$[\text{Ag}_2(\text{NO}_2\text{-L}_3)_2(\mu\text{-tu})_2]2\text{NO}_3$ (3)	7,83±0,089	>50	13,9±1,20
$[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ (4)	0,55±0,014	0,40±0,02	0,25±0,010
$[\text{Ag}_2(\text{CN-L}_5)_2(\mu\text{-tu})_2]2\text{NO}_3$ (5)	3,47±0,06	4,88±0,121	6,36±0,218
Cisplatina ^{86,87}	11,84 ± 1,19	13,2 ± 1,84	15,0 ± 1,40

De modo geral os ligantes com substituintes: CH_3 , Cl e NO_2 mostraram ser inativos ou considerados com baixa atividade frente a todas as linhagens celulares testadas. Os ligantes NON-L_4 e CN-L_5 se apresentaram significativamente ativos, superando os valores encontrados pela cisplatina frente a todas as linhagens testadas.

Para os complexos (2) e (3) a coordenação do ligante ao centro metálico foi responsável por gerar um significativo aumento na atividade citotóxica em relação aos ligantes livres. O complexo (1) não exibe atividades em nenhuma das células in-

vestigadas. O complexo **(2)** apresentou atividade citotóxica frente a linhagem resistente a cisplatina. Os resultados apresentados para o complexo **(3)** se destacam devido ao maior ganho de atividade citotóxica quando comparado ao ligante livre.

Os complexos **(4)** e **(5)** acompanharam a atividade de seus respectivos ligantes, apresentando valores significativamente mais baixos que a cisplatina, os valores de IC_{50} encontrados, indicam que neste caso, a coordenação ao metal influenciou de maneira mais efetiva a atividade frente a linhagem DU-145. Vale destacar que estes dois complexos foram os que apresentaram interações mais significativas com a molécula do DNA. Contudo, somente parte da atividade citotóxica pode ser atribuída a capacidade de interação com a biomolécula, visto que as constantes de interação apresentam valores moderados, e adicionalmente, o complexo **(3)**, que não apresenta nenhuma interação com o DNA, também se mostrou capaz de afetar a viabilidade celular.

De fato, a ideia de um único alvo se torna cada vez menos provável, uma vez que muitos compostos de coordenação se mostram capazes de interagir com diversas moléculas no ambiente biológico. Outra possível conclusão a respeito dos dados de viabilidade celular está relacionada com a baixa especificidade destes compostos já que atuam de forma indistinta em células tumorais e em células não tumorais, também vale reforçar que essas não são dos mesmos tecidos, sendo uma de pulmão e duas tumorais, ovário e próstata. Face ao exposto, conclui-se que os compostos sintetizados apresentam características estruturais interessantes que lhes conferem significativos índices de inibição do crescimento celular.

6. Conclusões

O trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões preliminares:

- ✓ Sintetizou-se cinco ligantes estendidos derivados da 1,10-fenantrolina e cinco complexos inéditos de prata (I) de fórmula $[Ag_n(R-L_{(n)})_2(\mu-tu)_2](NO_3)_2$, onde $n = 1$ ou 2 , $R-L_{(n)}$ = ligante fenantrolínico estendido com diaminas aromáticas substituídas e tu = tiouréia;
- ✓ Todos os compostos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas na região do ultra violeta visível e infravermelho, ressonância magnética nuclear de 1H e $^{13}C\{^1H\}$, análise elementar e condutividade molar. Esses dados experimentais sugerem que os complexos **(1)**, **(2)**, **(3)** e **(5)** foram obtidos na forma de dímeros, com os ligantes tiouréias em ponte, enquanto, o complexo **(4)** foi isolado na forma monometálica;
- ✓ Para o complexo $[Ag(CN-L_5)(tu)_2]NO_3$ foi possível determinar sua estrutura a partir da obtenção de monocristais aptos para a difração. O complexo apresenta em uma geometria tetraédrica distorcida ao redor do centro metálico, sendo seus sítios de coordenação ocupados por um ligante fenatrolínico coordenado de maneira bidentada e duas moléculas de tiouréias. Confirmando sua natureza eletrolítica, observou-se a presença do contra íon nitrato. Estes dados contrastam-se com os dados espectroscópicos, no entanto, acredita-se que as diferentes condições de obtenção dos sólidos, pó e cristais, foram responsáveis por esta dualidade, comum em complexos de prata.
- ✓ Os complexos mostraram estabilidade em soluções de DMSO. Todos exibiram lipofilicidades positivas, mostrando terem capacidade de permear a membrana celular;
- ✓ Somente os complexos **(4)** e **(5)** demonstraram ter interações com o CT-DNA via UV-Vis, com constantes de ligações (K_b) de 10^4 e 10^5 , respectivamente, caracterizadas como interações de moderadas a fortes com o DNA. Via dicroísmo circular,

foi possível constatar que os complexos não demonstraram afetar de forma significativa as bandas monitoradas, indicando assim uma possível interação eletrostática ou via sulcos do DNA. No entanto, outros tipos de testes devem ser realizados para provar tal hipótese.

- ✓ Os complexos $[\text{Ag}(\text{NON-L}_4)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ (**4**) e $[\text{Ag}_2(\text{CN-L}_5)_2(\mu\text{-tu})_2](\text{NO}_3)_2$ (**5**) mostraram altas atividades citotóxicas provindas da bioatividade dos ligantes planares, trata-se de complexos com potenciais ações inibitórias de crescimento celular. Provavelmente o DNA não é o único alvo destes complexos, sendo necessária uma investigação mais profunda sobre o modo de ação destes compostos.
- ✓ Confrontando o objetivo principal com os resultados obtidos, pode-se constatar que o arcabouço molecular projetado se mostrou de grande interesse, uma vez que a viabilidade celular foi reduzida em 50% a partir de baixas concentrações, em alguns casos na faixa de nano molar. Indicando que estas características estruturais são promissoras no desenvolvimento de novos compostos de Ag (I) como agentes anticâncer. No entanto, no que diz respeito a interação com o DNA, constatou-se que nem todos os complexos foram capazes de afetar a conformação da biomolécula, sugerindo que os ligantes fenantrolínicos estendidos atuam de forma distinta entre si, e que possivelmente a citotoxicidade dos complexos provêm de vários alvos.
- ✓ Se faz necessário o uso de outras técnicas de caracterizações para comprovar as estruturas propostas, tais como: massas de alta resolução; RMN de ^{107}Ag ; DOSY.
- ✓ Para confirmar o modo de interação desses complexos frente a biomolécula de DNA, experimentos adicionais de viscosidade, deslocamento de brometo de etídio e competição com Hoechst devem ser realizados.

7. Referências Bibliográficas

1. World Health, O. *WHO report on cancer. Investing Wisely and Providing Care for All* (2020).
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.* (2020).
3. De Almeida, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova* **28**, 118–129 (2005).
4. Chabner, B. A. & Longo, D. L. Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practice. *Cancer Chemother. Biother. Princ. Pract.* **6**, 1–1935 (2011).
5. Bodenshtein, T. M. & Welch, D. R. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* **1**, 1–11 (2008).
6. National Cancer Institute. Metastatic Cancer. <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>, acessada em Março 2020.
7. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. <http://www.inca.org.br/cancer>, acessada em Março 2020.
8. Rubovszky, G. & Horváth, Z. Recent advances in the neoadjuvant treatment of breast cancer. *J. Breast Cancer* **20**, 119–131 (2017).
9. Barra, C. V. & Netto, A. V. G. Antitumour complexes and DNA interactions and their tools of analysis: An approach to metalointercalators. *Rev. Virtual Quim.* **7**, 1998–2016 (2015).
10. Neves, A. P. & Vargas, M. D. Platinum(II) complexes in cancer therapy. *Rev. Virtual Quim.* **3**, 196–209 (2011).
11. Fontes, A. P. S., César, E. T. & Beraldo, H. A química inorgânica na Terapia do Câncer. *Cad. Temáticos química Nov. na Esc.* 2–7 (2005).
12. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573–584 (2007).
13. Schwietert, C. W. & McCue, J. P. Coordination compounds in medicinal chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **184**, 67–89 (1999).
14. Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* **3**, 18–30 (1961).
15. Bauer, W. & Vinograd, J. The interaction of closed circular DNA with intercalative

- dyes. III. Dependence of the buoyant density upon superhelix density and base composition. *J. Mol. Biol.* **54**, 281–298 (1970).
16. Liu, H. K. & Sadler, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. *Acc. Chem. Res.* **44**, 349–359 (2011).
 17. Nial J. Wheate, Craig R. Brodie, J. Grant Collins, Sharon Kemp & Janice R. Aldrich-Wright. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. *Mini-Reviews Med. Chem.* **7**, 627–648 (2007).
 18. Neidle, S. & Abraham, Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acid. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **17**, 73–121 (1984).
 19. Keck, M. V. & Lippard, S. J. Unwinding of Supercoiled DNA by Platinum-Ethidium and Related Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3386–3390 (1992).
 20. Zeglis, B. M., Pierre, V. C. & Barton, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chem. Commun.* **7345**, 4565–4579 (2007).
 21. Shahabadi, N. & Mahdavi, M. DNA Interaction Studies of a Cobalt(II) Mixed-Ligand Complex Containing Two Intercalating Ligands: 4,7-Dimethyl-1, 10-Phenanthroline and Dipyrido[3,2- a : 2',3' - c]phenazine . *ISRN Inorg. Chem.* **2013**, 1–7 (2013).
 22. Angeles-Boza, A. M. *et al.* DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium(II) dppz complexes: Correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity. *Inorg. Chem.* **43**, 8510–8519 (2004).
 23. Chen, X. *et al.* Effects of intercalative ligands on the DNA binding, DNA topoisomerase II and DNA transcription inhibition of polypyridyl ruthenium(II) complexes. *Inorganica Chim. Acta* **378**, 140–147 (2011).
 24. Liu, J. G. *et al.* Synthesis, characterization and DNA-binding properties of novel dipyridophenazine complex of ruthenium(II): [Ru(IP)2(DPPZ)]₂⁺. *J. Inorg. Biochem.* **73**, 117–122 (1999).
 25. Sastri, C. V., Eswaramoorthy, D., Giribabu, L. & Maiya, B. G. DNA interactions of new mixed-ligand complexes of cobalt(III) and nickel(II) that incorporate modified phenanthroline ligands. *J. Inorg. Biochem.* **94**, 138–145 (2003).
 26. Peng, B. *et al.* Synthesis, characterization and DNA-binding studies of ruthenium(II) mixed-ligand complexes containing dipyrido[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxaline. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **74**, 896–901 (2009).

27. Erkkila, K. E., Odom, D. T. & Barton, J. K. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. *Chem. Rev.* **99**, 2777–2795 (1999).
28. Barton, J. K. Metals and DNA: molecular left-handed complements. *Science* (80- .). **233**, 727 LP – 734 (1986).
29. Alama, A., Tasso, B., Novelli, F. & Sparatore, F. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discovery Today* vol. 14 500–508 (2009).
30. Hartinger, C. G. *et al.* From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.* **100**, 891–904 (2006).
31. Rademaker-Lakhai, J. M., Van Den Bongard, D., Pluim, D., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3717–3727 (2004).
32. Louie, A. Y., Meade, T. J. & Lippard, S. J. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem. Rev.* **99**, 2711–2734 (1999).
33. Marverti, G. *et al.* Studies on the anti-proliferative effects of novel DNA-intercalating bipyridyl-thiourea-Pt(II) complexes against cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 699–712 (2008).
34. Kapdi, A. R. & Fairlamb, I. J. S. Anti-cancer palladium complexes: A focus on PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4751–4777 (2014).
35. Zhao, G. *et al.* Ethylenediamine-palladium(II) complexes with pyridine and its derivatives: Synthesis, molecular structure and initial antitumor studies. *J. Inorg. Biochem.* **73**, 145–149 (1999).
36. Barra, C. V. *et al.* DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and thioureas. *Inorganica Chim. Acta* **446**, 54–60 (2016).
37. Butsch, K., Gust, R., Klein, A., Ott, I. & Romanski, M. Tuning the electronic properties of dppz-ligands and their palladium(ii) complexes. *Dalt. Trans.* **39**, 4331–4340 (2010).
38. Nordén, B. Structure of DNA metal complexes in solution studied by linear and circular dichroism. [Pt(II)(ethylenediamine)(2,2'-dipyridine)]²⁺ binds strongly to

- DNA by intercalation. [Cu(II)(2,2'-dipyridine)₂]²⁺ is not intercalated. *Inorganica Chim. Acta* **31**, 83–95 (1978).
39. Movahedi, E., Rezvani, A. R. & Razmazma, H. Binding interaction of a heteroleptic silver(I) complex with DNA: A joint experimental and computational study. *Int. J. Biol. Macromol.* **126**, 1244–1254 (2019).
 40. 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. *J. Inorg. Biochem.* **159**, 120–132 (2016).
 41. Lansdown, A. B. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J. Wound Care* **11**, 125–130 (2002).
 42. Lansdown, A. B. Silver. 2: Toxicity in mammals and how its products aid wound repair. *J. Wound Care* **11**, 173–177 (2002).
 43. Sigel, A., Sigel, H. & Sigel, R. K. O. Metal ions in toxicology: effects, interactions, interdependencies. *Metal ions in life sciences* (2011) doi:10.1515/9783110436624.
 44. Fuks, L., Sadlej-Sosnowska, N., Samochocka, K. & Starosta, W. Experimental and quantum chemical studies of structure and vibrational spectra of platinum(II) and palladium(II) thiourea chlorides. *J. Mol. Struct.* **740**, 229–235 (2005).
 45. da Silva Miranda, F. *et al.* Synthesis of substituted dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxaline. *Tetrahedron* **64**, 5410–5415 (2008).
 46. Yamada, M., Tanaka, Y., Yoshimoto, Y., Kuroda, S. & Shimao, I. Synthesis and Properties of Diamino-Substituted Dipyrido [3,2- a : 2',3'- c]phenazine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65**, 1006–1011 (1992).
 47. Choi, C., Mutai, T., Arita, S. & Araki, K. A novel fluorescent 2,2'-bipyridine derivative prepared by coupling to a fluorescent aminophenazine – fluorescence properties and response toward various cations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 243–247 (2000) doi:10.1039/a908122d.
 48. Segura, D. F. *et al.* Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N,N-chelating ligands and thiourea: X-ray structure of [Ag(bpy)(μ-tu)₂](NO₃)₂ (bpy = 2,2'-bipyridine; Tu = thiourea). *Polyhedron* **79**, 197–206 (2014).
 49. Kaeser, A., Delavaux-Nicot, B., Duhayon, C., Coppel, Y. & Nierengarten, J. F.

- Heteroleptic silver(I) complexes prepared from phenanthroline and bisphosphine ligands. *Inorg. Chem.* **52**, 14343–14354 (2013).
50. Wang, Y. *et al.* Synthesis, structure, luminescent properties, and photocatalytic behavior of 0D–3D silver(I) complexes bearing both diphosphine ligands and 1,10-phenanthroline derivatives. *Polyhedron* **155**, 135–143 (2018).
 51. Heteroleptic, I., Schmittel, M., Ganz, A. & Herderich, M. Heteroleptic silver(I) complexes. *Inorg. Chem.* **39**, 353–359 (2000).
 52. Popolin, C. P. *et al.* Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. *PLoS One* **12**, 1–21 (2017).
 53. Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K. & Puschmann, H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 339–341 (2009).
 54. Sheldrick, G. M. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **71**, 3–8 (2015).
 55. Bourhis, L. J., Dolomanov, O. V., Gildea, R. J., Howard, J. A. K. & Puschmann, H. The anatomy of a comprehensive constrained, restrained refinement program for the modern computing environment - Olex2 dissected. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **71**, 59–75 (2015).
 56. Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208–218 (1961).
 57. Reichmann, M. E., Rice, S. A., Thomas, C. A. & Doty, P. A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3047–3053 (1954).
 58. Villarreal, W. *et al.* Copper(I)-Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. *Inorg. Chem.* **56**, 3781–3793 (2017).
 59. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. & Wothers, P. Organic Chemistry. *Am. Nat.* (2001) doi:10.1086/278635.
 60. Henderson, W., Nicholson, B. K., Dinger, M. B. & Bennett, R. L. Thiourea monoanion and dianion complexes of rhodium(III) and ruthenium(II). *Inorganica Chim. Acta* **338**, 210–218 (2002).
 61. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. (John Wiley & Sons, Inc., 2008). doi:10.1002/9780470405840.
 62. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle, D. J. Spectrometric identification of

- organic compounds 7ed 2005 - Silverstein, Webster & Kiemle.pdf. *Microchemical Journal* (2005) doi:10.1016/0026-265X(76)90069-2.
63. Zheng, C. *et al.* Theoretical studies on a new furazan compound bis[4-nitraminofurazanyl-3-azoxy]azofurazan (ADNAAF). *J. Mol. Model.* **22**, (2016).
64. Yıldız, U. *et al.* The comparative study of the DNA binding and biological activities of the quaternized dcnq as a dicationic form and its platinum(II) heteroleptic cationic complex. *Bioorg. Chem.* **87**, 70–77 (2019).
65. Rotondo, A., Barresi, S., Cusumano, M. & Rotondo, E. Structural and dynamic NMR characterization of [Pd(bipy)(R-thiourea) 2] 2+ and [Pd(phen)(R-thiourea) 2] 2+ cations. *Polyhedron* **45**, 23–29 (2012).
66. Solomons, T. W. G. & Fryhle, C. B. Organic Chemistry. *John Wiley Sons Inc.* (2012) doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
67. Segura, D. F. Síntese, caracterização e estudo de atividade biológica de complexos de prata(I) contendo ligantes baseados na 1,10-fenantrolina e tiouréia. Programa de Pós Graduação em Química-IQ-UNESP. 137.
68. D'Amelio, N., Aroulmoji, V., Toraldo, A., Sundaraganesan, N. & Anbarasan, P. M. Aggregation properties and structural studies of anticancer drug Irinotecan in DMSO solution based on NMR measurements. *J. Mol. Struct.* **1013**, 26–35 (2012).
69. Schweighauser, L., Häussinger, D., Neuburger, M. & Wegner, H. A. Symmetry as a new element to control molecular switches. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 3371–3379 (2014).
70. Perras, J. H., Mezibroski, S. M. J., Wiebe, M. A. & Ritch, J. S. Diverse silver(i) coordination chemistry with cyclic selenourea ligands. *Dalt. Trans.* **47**, 1471–1478 (2018).
71. Fanizzi, F. P., Lanfranchi, M., Natile, G. & Tiripicchio, A. Platinum(II) Complexes with Monocoordinated 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline and Phosphine Ligands. Exchange of the Donor Nitrogen and Rotation about the Pt-P and P-C Bonds Studied by NMR Spectroscopy: Arene Stacking as an Intramolecular Brake. *Inorg. Chem.* **33**, 3331–3339 (1994).
72. Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G. & Vyvyan, J. Introdução à espectroscopia. *Cengage Learn.* (2012) doi:10.1590/S0100-40422007000700048.
73. Reddy, K. L., Reddy, Y. H. K. & Satyanarayana, S. DNA-binding and photocleavage properties of Ru(II) polypyridyl complexes with DNA and their

- toxicity studies on eukaryotic microorganisms. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **28**, 953–968 (2009).
74. Garcia Velho, R. Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. *Programa Pós-Graduação em Química - UF* (2006).
75. Ravindran, B., Madhurambal, G., Mariappan, M. & Mojumdar, S. C. Synthesis and characterization of some single crystals of thiourea urea zinc chloride. *J. Therm. Anal. Calorim.* **104**, 893–899 (2011).
76. Rama, A. C. R., Veiga, F., Figueiredo, I. V., Sousa, A. & Caramona, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina: estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **42**, 73–94 (2006).
77. Sirajuddin, M., Ali, S. & Badshah, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **124**, 1–19 (2013).
78. Hildebrand, J. H. & Benesi, H. A. Interaction of iodine with aromatic hydrocarbons [15]. *Nature* **164**, 963 (1949).
79. Mei, H. Y. & Barton, J. K. Chiral Probe for A-Form Helices of DNA and RNA: Tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II). *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7414–7416 (1986).
80. Arjmand, F. & Jamsheera, A. DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV). *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **78**, 45–51 (2011).
81. Afrati, T. *et al.* Copper inverse-9-metallacrown-3 compounds interacting with DNA. *Dalt. Trans.* **39**, 765–775 (2010).
82. Rehman, S. U., Sarwar, T., Husain, M. A., Ishqi, H. M. & Tabish, M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **576**, 49–60 (2015).
83. Zaha, A., Ferreira, He. B. & Passaglia, L. M. P. *Biologia Molecular Basica. Série Ciência XXI* (2003). doi:10.1016/j.renene.2011.07.015.
84. Cunha, B. N. *et al.* Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation. *Inorg. Chem.* **59**, 5072–5085 (2020).
85. Indumathy, R., Radhika, S., Kanthimathi, M., Weyhermuller, T. & Unni Nair, B.

-
- Cobalt complexes of terpyridine ligand: Crystal structure and photocleavage of DNA. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 434–443 (2007).
86. Lima, M. A. *et al.* Palladium(II) complexes bearing thiosemicarbazone and phosphines as inhibitors of DNA-Topoisomerase II enzyme: Synthesis, characterizations and biological studies. *Inorg. Chem. Commun.* **112**, 107708 (2020).
87. Stilgenbauer, M. *et al.* A spermine-conjugated lipophilic Pt(IV) prodrug designed to eliminate cancer stem cells in ovarian cancer. *Chem. Commun.* **55**, 6106–6109 (2019).

8. Apêndices

Figura A1. Espectro de RMN de ^1H para o ligante 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Solvente: CDCl_3 .

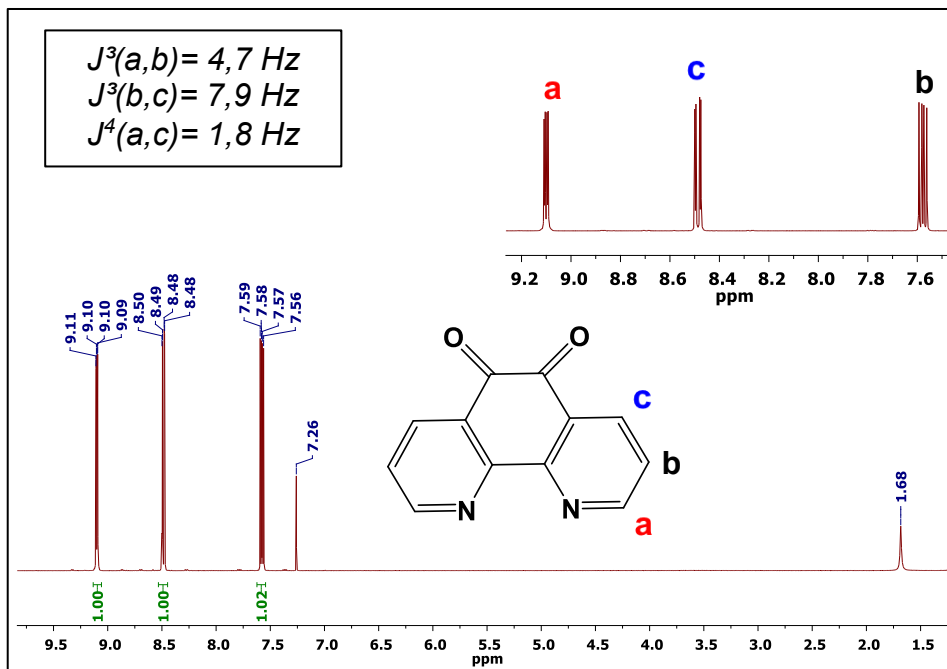


Figura A2. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{-L}_1)(\text{tu})]$ (**1**). Solvente: DMSO-d_6 .

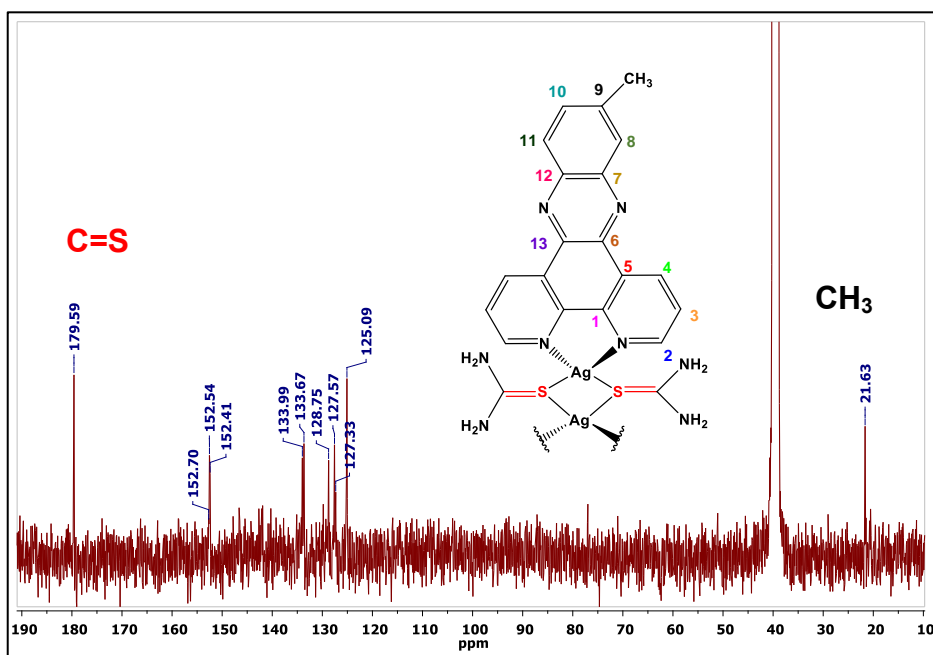


Figura A3. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ag}(\text{Cl-L}_2)(\text{tu})]$ (**1**). Solvente: DMSO- d_6 .

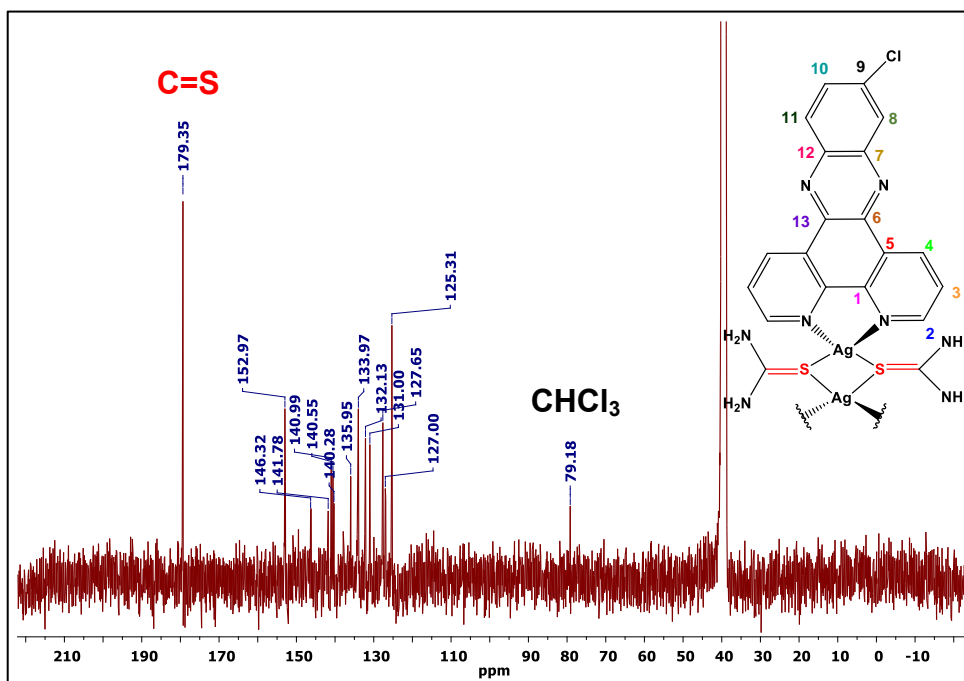


Figura A4. Espectro de RMN de ^1H para o ligante tiouréia (tu). Solvente: DMSO- d_6 .

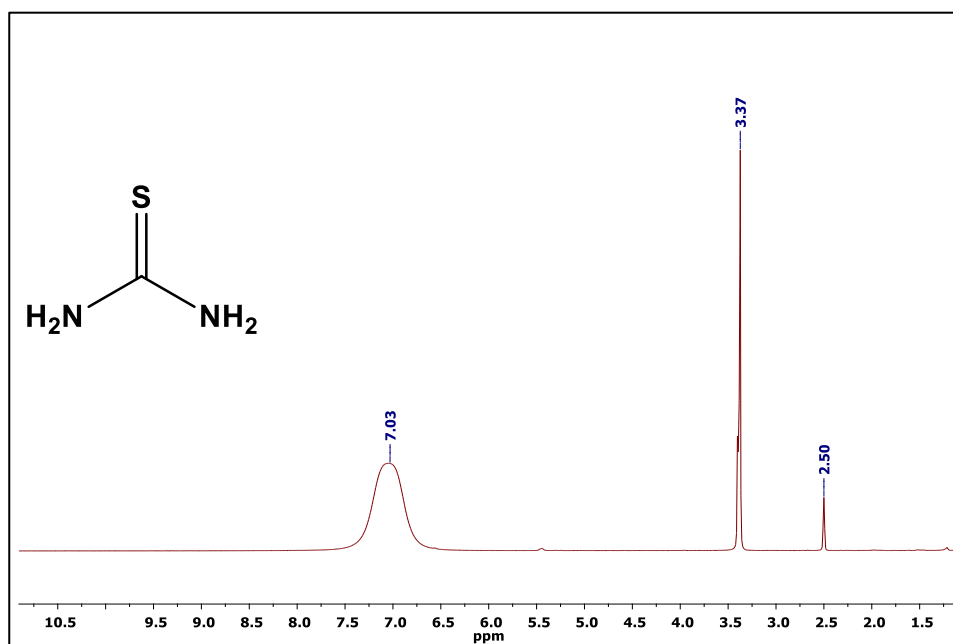


Figura A5. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o ligante tiouréia (tu). Solvente: DMSO-d_6

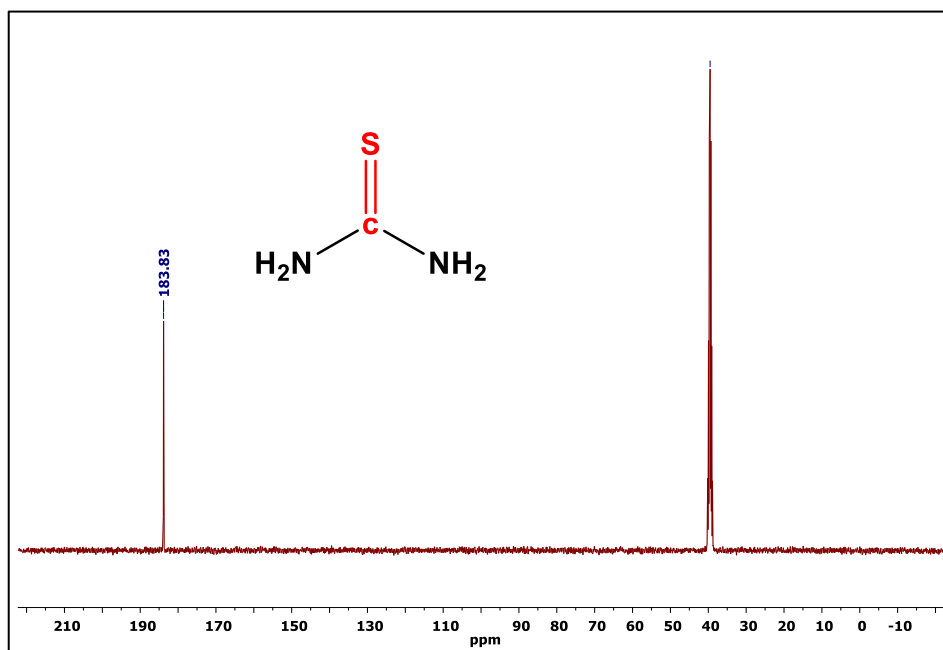


Figura A6. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo $[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{-L}_1)(\text{tu})]$ (**1**).

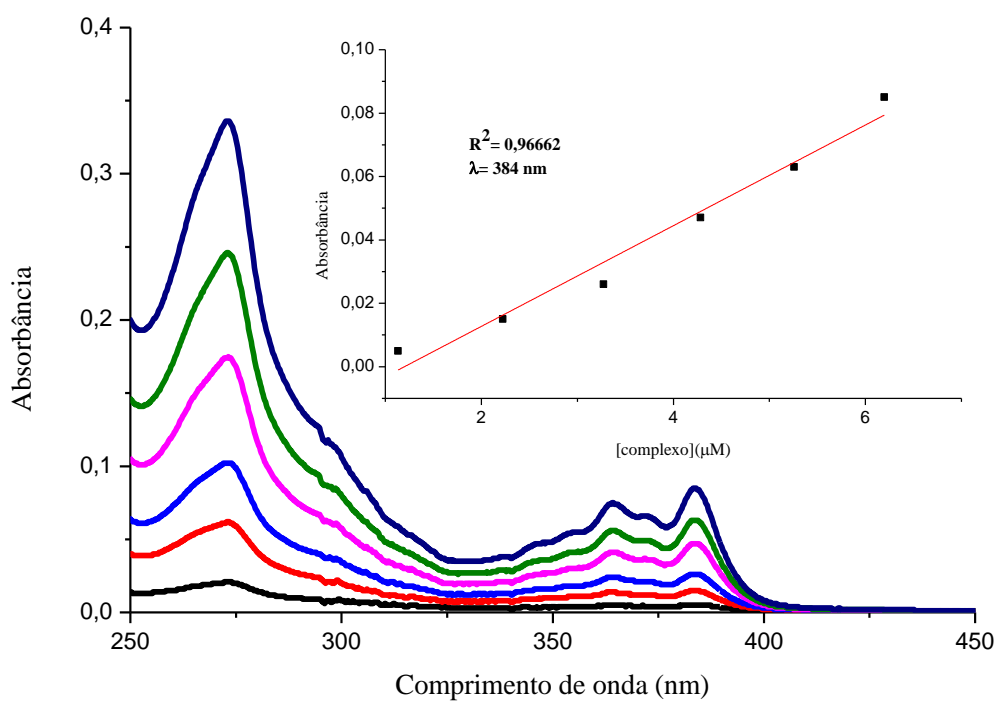


Figura A7. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo [Ag(Cl-L₂)(tu)] (**2**).

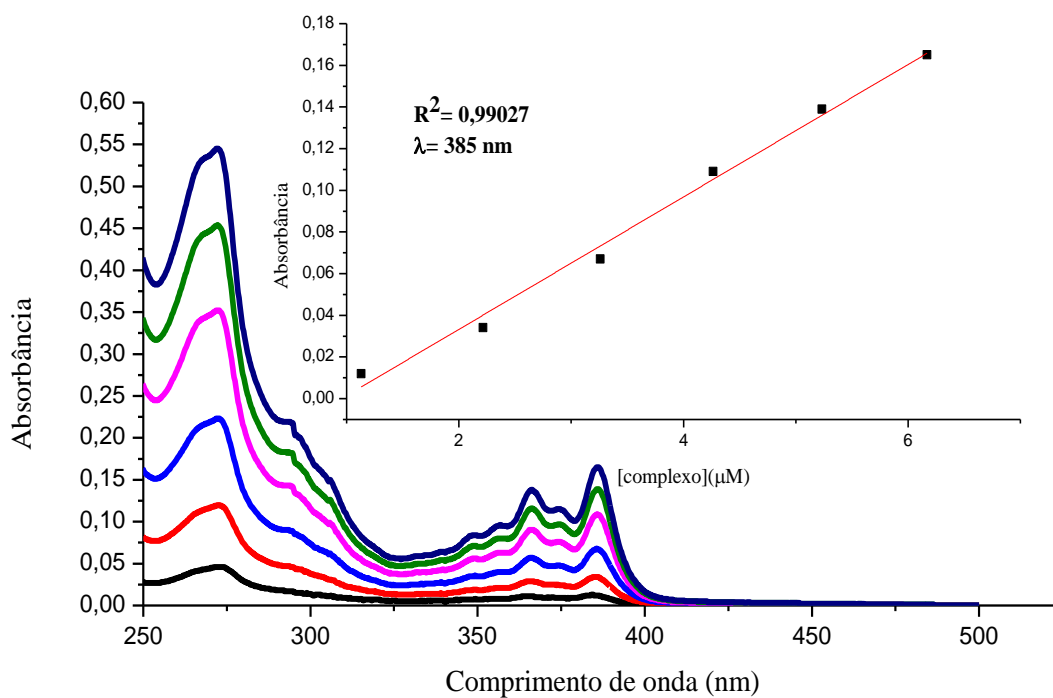


Figura A8. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo [Ag(NO₂-L₃)(tu)] (**3**).

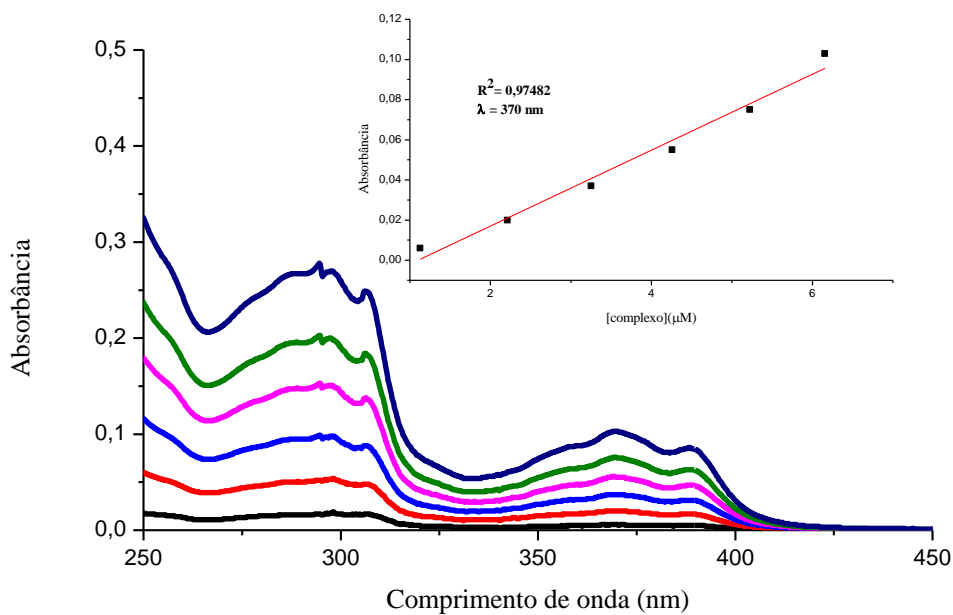


Figura A9. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo [Ag(NON-L₄)(tu)₂] (4).

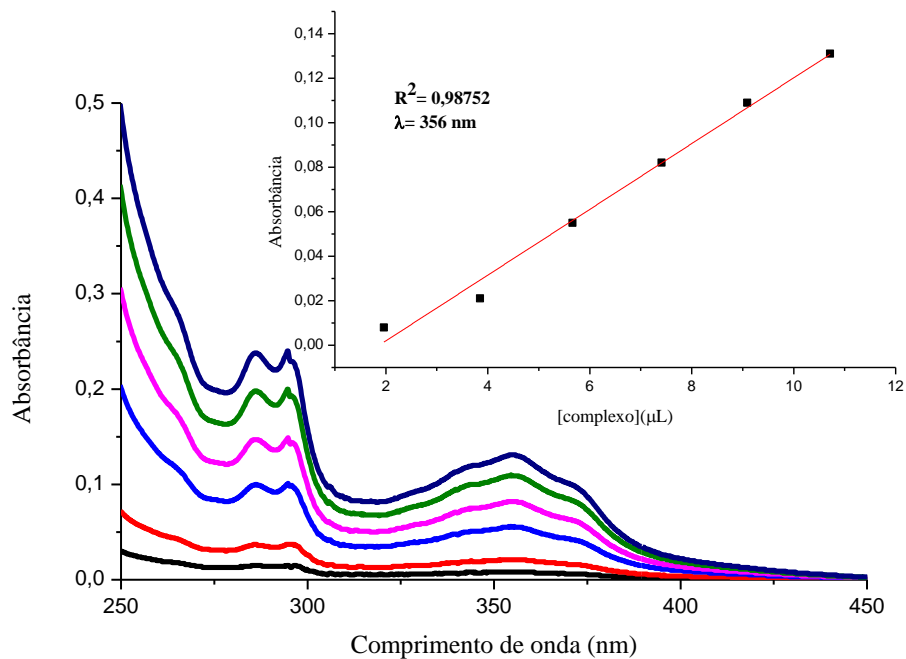


Figura A10. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo [Ag(CN-L₅)(tu)₂]₂NO₃ (5).

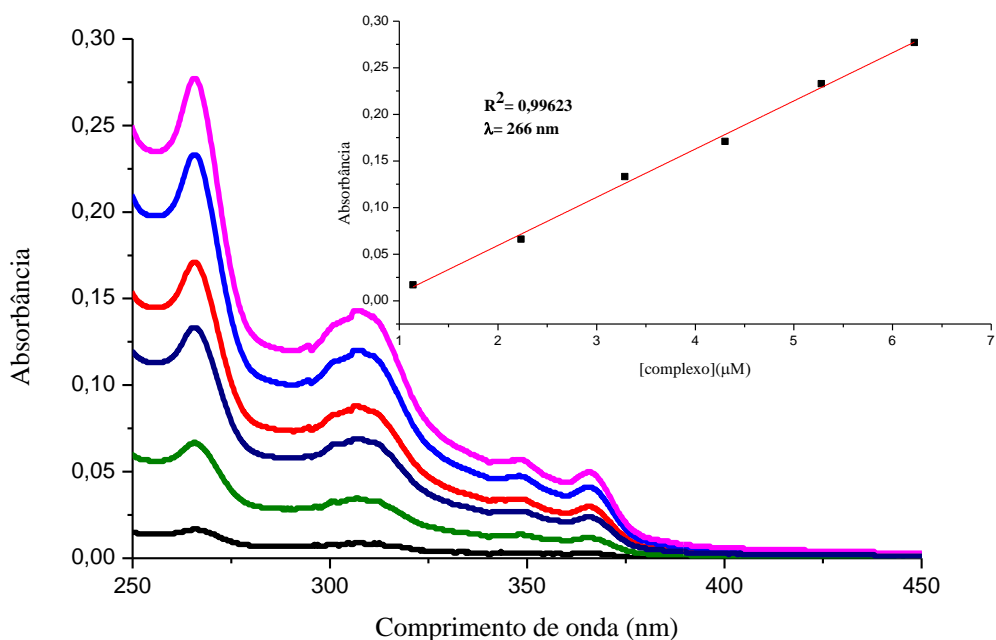


Tabela A.1. Dados de difração para o complexo $[\text{Ag}(\text{CN-L}_5)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ (5).

$[\text{Ag}(\text{CN-L}_5)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$	
Fórmula empírica	$\text{C}_{10}\text{H}_{58}\text{Ag}_2\text{N}_{48}\text{O}_6\text{S}_4$
Peso molecular	2419.940
Sistema cristalino	triclínico
Grupo espacial	P-1
Dimensões da cela unitária	$a/\text{Å}$ 10.9479(5) $b/\text{Å}$ 20.2628(8) $c/\text{Å}$ 25.863(1) $\alpha/^\circ$ 70.040(4) $\beta/^\circ$ 85.751(3) $\gamma/^\circ$ 75.574(4)
Volume Å^3	5222.3(4)
Z	2
Densidade calculada g/cm^3	1.539
Coefficiente de absorção μ/mm^{-1}	0.537
F (000)	2446.3
Tamanho do cristal mm^3	$0.433 \times 0.24 \times 0.145$
Alcance de θ para coleta	5.1 to 54°
Alcance dos índices	$-17 \leq h \leq 17, -31 \leq k \leq 31, -41 \leq l \leq 40$
Reflexões coletadas	100596
Reflexões independentes	22740 [$R_{\text{int}} = 0.0438, R_{\text{sigma}} = 0.0734$]
Método de refinamento	Matriz dos mínimos quadrado em F^2
Índices R final [$ \geq 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0569, wR2 = 0.1280$
Final R indexes [all data]	$R1 = 0.1017, wR2 = 0.1656$

Figura A11. Célula unitária para o complexo $[\text{Ag}(\text{CN-L}_5)(\text{tu})_2]\text{NO}_3$ e ligantes livres presentes no modo de cristalização.