

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

“Avaliação da atividade bactericida e antineoplásica de novos complexos de Ag(I) contendo semicarbazonas e trifenilfosfina como ligantes.”

Vitor Yohan Grosskopf Almeida*

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 CNPq**

São Carlos - SP
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Vitor Yohan Grosskopf Almeida, realizada em 27/09/2019:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha
UFSCar

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
UNESP

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
UFSCar

“A vida é paradoxalmente coincidente
com a tirania irônica aplicável à definição
inigualável de entropia reversa”

- *Douglas Adams*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a mim mesmo por todo esforço e comprometimento que dei a esse trabalho.

Agradeço a minha companheira, fiel escudeira, mais do que uma amiga Jecika por me apoiar em todos os momentos desde a nossa graduação, sem perder um dia ao meu lado, uma das pessoas mais importantes e que tenho o prazer de estar junto.

A minha família, em especial meus pais, por serem os pais mais pais que um filho pode ter. "Moms" e "pops" e "brodi", sempre sendo pilares na minha vida, me preparando para os momentos mais decisivos e importantes.

Ao professor Fillipe, pela amizade e profissionalismo, por abrir as portas do laboratório e por me dar a oportunidade e confiança de trabalhar em seu grupo. A todos os meus amigos, Wystan, Gabi, mestre/Mikey/Mauro/mito/monstro (M⁵), Lucas, Vinícius, Fabio LoL, Josias, George, Daniel 萩原, Herisson, Ludibriga por conseguirem manter minha sanidade mental em nível saudável.

A todos os professores da FURG, por me dar suporte na minha primeira formação, em especial profa. Vanessa (Diva) e prof. Leandro. Sem eles eu provavelmente não estaria nessa etapa.

Agradeço ao grupo LERCI, professor Alzir, João Honorato, Gabriel, Analu, Celis, Tamiris, Rafael e Bia, pelo acolhimento inicial que tive ao chegar em São Carlos, e me iniciarem na vida da pós-graduação.

Agradeço a todos os professores que tive contato, sendo em sala de aula, em outros encontros, em lições, ou em conversas construtivas e desconstrutivas. Aos grupos de pesquisa da UNESP Araraquara e aos professorares Dr. Adelino e Dr. Saulo, pela parceria e pelas análises feitas.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP pela bolsa de estudos e fomento do projeto de pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavra	Abreviatura
(<i>E</i>)-2-((<i>E</i>)-3-fenilalideno)hidrazina-1-carboxamida	CSC
(<i>E</i>)-2-((<i>E</i>)-4-fenil-but-3-en-2-lideno)hidrazina-1-carboxamida	BSC
Ácido clorídrico	HCl
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido etilenodiamino tetra-acético	EDTA
Complexo [Ag(BSC)(PPh ₃) ₂]NO ₃	BAP
Complexo [Ag(BSC) ₂]NO ₃	BBA
Complexo [Ag(CSC)(PPh ₃) ₂]NO ₃	CAP
Complexo [Ag(CSC) ₂]NO ₃	CCA
Dimetilformamida	DMF
Dimetilsulfóxido	DMSO
Dimetilsulfóxido deuterado	DMSO-d ₆
Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	RMN
Espectroscopia na região do infravermelho	IV
Espectroscopia na região do ultravioleta visível	UV-vis
Etanol	ETOH
Heteronuclear Single Quantum Coherence	HSQC
Lipopolissacarídeos	LPS
Metanol	METOH
Metro	m
Nanômetro	nm
Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio	MTT
Soro fetal bovino	FBS
Tetraidrofurano	THF
Trifenilfosfina	PPh ₃

LISTA DE TABELAS

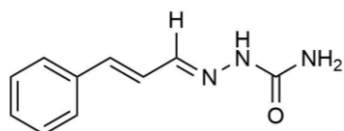
TABELA 1.1: Valores de CIM para o ligante livre (catsc) o complexo [Ag(catsc)(PPh ₃) ₂]NO ₃	8
TABELA 3.1: Reagentes e suas respectivas procedências	13
TABELA 4.1: Dados de ponto de fusão e ponto de ebulição dos compostos.	22
TABELA 4.2: Valores experimentais e teóricos para análise elementar dos compostos sintetizados.	22
TABELA 4.3: Dados de condutividade molar para os complexos sintetizados.	23
TABELA 4.4: Dados de infravermelho das bandas diagnóstico para o ligante BSC e de seus respectivos complexos (Vide FIGURA 4.1).	25
TABELA 4.5: Dados de infravermelho das bandas diagnóstico para o ligante CSC e seus respectivos complexos (Vide FIGURA 4.2).	25
TABELA 4.6: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para os complexos BBA e BAP. ...	36
TABELA 4.7: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para os complexos CCA e CAP... ..	45
TABELA 4.8: Principais bandas na região do UV-vis para os compostos sintetizados.	48
TABELA 4.9: Estabilidade dos compostos em DMSO por condutividade molar.	49
TABELA 4.10: Dados de IC ₅₀ (μmol·L ⁻¹) para os compostos sintetizados.	51
TABELA 4.11: Índice de seletividade para as linhagens celulares estudadas.	53
TABELA 4.12: Porcentagem de inibição dos compostos para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 μM testadas.	62
TABELA 4.13: Porcentagem de inibição dos compostos para <i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 μmol·L ⁻¹ testadas.	62
TABELA 4.14: Porcentagem de inibição dos compostos para <i>Escherichia coli</i> sorotipo O157:H7. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 μmol·L ⁻¹ testadas.	62
TABELA 4.15: Porcentagem de inibição dos compostos para <i>Salmonella thipy</i> ATCC 6539. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 μmol·L ⁻¹ testadas.	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Estruturas dos complexos de platina aprovados pelo FDA para uso clínico.	2
FIGURA 1.2: Complexos de prata com atividade antitumoral, sintetizados por Banti, C. N. <i>et al.</i> ²⁶	4
FIGURA 1.3: Complexos de prata com atividade antitumoral, sintetizados por Poyraz M. <i>et al.</i> ²⁷	5
FIGURA 1.4: Estruturas dos agentes colorimétricos usados no método de Gram.	7
FIGURA 1.5: Estrutura do complexo [Ag(catsc)(PPh ₃) ₂]NO ₃	8
FIGURA 1.6: Estrutura do fármaco auranofina.	9
FIGURA 1.7: Estrutura geral de compostos tio e semicarbazonas.....	10
FIGURA 3.1: Esquema de reação geral dos ligantes sintetizados.	13
FIGURA 3.2 Esquema de reação para a síntese dos complexos bisquelatos.	14
FIGURA 3.3: Esquema de reação para a síntese dos complexos derivados de trifenilfosfina e semicarbazona.	14
FIGURA 4.1: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante BSC e seus respectivos complexos.	24
FIGURA 4.2: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante CSC e de seus respectivos complexos.	25
FIGURA 4.3: Numeração referencial para os complexos. (A) BSC; (B) BBA; (C) BAP; (D) CSC; (E) CCA; e (F) CAP.	27
FIGURA 4.4: Espectro de RMN ¹ H para o ligante BSC.....	28
FIGURA 4.5: Espectro de RMN ¹ H para o complexo BBA.	29
FIGURA 4.6: Espectro de RMN ¹³ C para o complexo BBA.....	30
FIGURA 4.7: Espectro bidimensional HSQC ¹ H ¹³ C ampliado para o complexo BBA.	31
FIGURA 4.8: Espectro de RMN ¹ H para o complexo BAP.	32
FIGURA 4.9: Espectro de RMN ¹³ C para o complexo BAP.....	34
FIGURA 4.10: Espectro ampliado de RMN bidimensional HSQC ¹ H ¹³ C para o complexo. BAP	34
FIGURA 4.11: Espectro de RMN ³¹ P para o complexo BAP.	35
FIGURA 4.12: Espectro de RMN ¹ H para o ligante CSC.....	37
FIGURA 4.13: Espectro de RMN ¹ H para o complexo CCA.....	38
FIGURA 4.14: Espectro de RMN bidimensional ¹ H - ¹ H (COSY) para o complexo CCA.....	39
FIGURA 4.15: Espectro de RMN ¹³ C para o complexo CCA.....	40

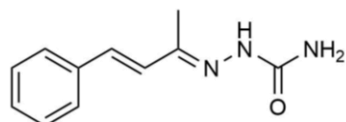
FIGURA 4.16: Espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C ampliado para o complexo CCA.....	40
FIGURA 4.17: Espectro de RMN ^1H para o complexo CAP.....	42
FIGURA 4.18: Espectro de RMN ^{13}C para o complexo CAP.....	43
FIGURA 4.19: Espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C ampliado para o complexo CAP.....	43
FIGURA 4.20: Espectro de RMN ^{31}P para o complexo CAP.....	44
FIGURA 4.21: Níveis de energia e transições eletrônicas.....	46
FIGURA 4.22: Espectro de absorção na região do ultravioleta visível para o ligante BSC e seus respectivos complexos.....	47
FIGURA 4.23: Espectro de absorção na região do ultravioleta visível para o ligante CSC e seus respectivos complexos.....	47
FIGURA 4.24: Estabilidade do complexo BAP em DMSO- d^6 por RMN ^{31}P	50
FIGURA 4.25: Estabilidade do complexo CAP em DMSO- d^6 por RMN ^{31}P	50
FIGURA 4.26: Dados de IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para os compostos sintetizados	52
FIGURA 4.27: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo BBA em presença de quantidades crescentes de DNA.....	55
FIGURA 4.28: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo BAP em presença de quantidades crescentes de DNA.....	56
FIGURA 4.29: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo CCA em presença de quantidades crescentes de DNA.....	56
FIGURA 4.30: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo CAP em presença de quantidades crescentes de DNA.....	57
FIGURA 4.31: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo BBA.....	58
FIGURA 4.32: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo BAP.....	58
FIGURA 4.33: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo CCA.....	59
FIGURA 4.34: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo CAP.....	59
FIGURA 4.35: Ensaio de mobilidade eletroforética do DNA superenovelado em presenças dos complexos BBA, BAP, CCA e CAP.....	61

ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES



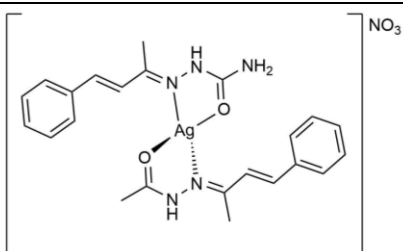
CSC

Massa molecular: 189,22 g·mol⁻¹



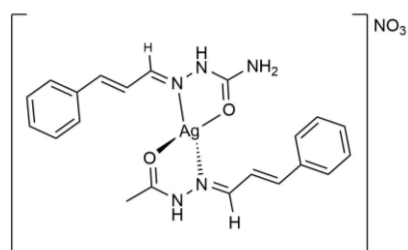
BSC

Massa molecular: 203,11 g·mol⁻¹



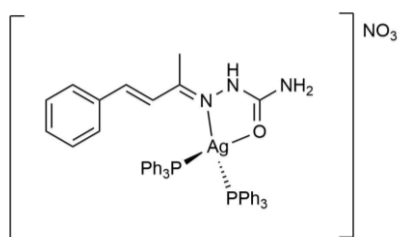
[Ag(BSC)₂]NO₃ (BBA)

Massa molecular: 575,37 g·mol⁻¹



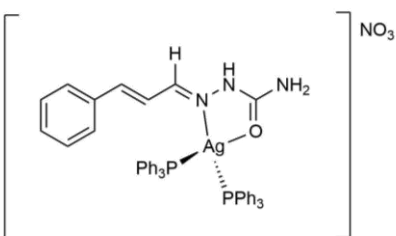
[Ag(CSC)₂]NO₃ (CCA)

Massa molecular: 547,32 g·mol⁻¹



[Ag(BSC)(PPh₃)₂]NO₃ (BAP)

Massa molecular: 883,63 g·mol⁻¹



[Ag(CSC)(PPh₃)₂]NO₃ (CAP)

Massa molecular: 897,70 g·mol⁻¹

RESUMO

Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA E ANTINEOPLÁSICA DE NOVOS COMPLEXOS DE Ag(I) CONTENDO SEMICARBAZONAS E TRIFENILFOSFINA COMO LIGANTES. O presente trabalho possui como finalidade avaliar a influência de ligantes semicarbazonas e trifenilfosfina em complexos de prata(I) do tipo $[Ag(L)(PPh_3)_2]^+$ e $[Ag(L)_2]^+$ (L= ligantes: (*E*)-2-((*E*)-3-phenylallylidene)hydrazine-1-carboxamide – CSC e (2*E*)-2-[(3*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ylidene]-hydrazinecarboxamide – BSC). Foram sintetizados e caracterizados quatro novos complexos de prata(I): dois bisquelatos $[Ag(CSC)_2]NO_3$ = CCA e $[Ag(BSC)_2]NO_3$ = BBA; dois complexos contendo os ligantes trifenilfosfina e CSC $[Ag(CSC)(PPh_3)_2]NO_3$ = (CAP) e trifenilfosfina com BSC $[Ag(BSC)(PPh_3)_2]NO_3$ = (BAP). Os compostos foram caracterizados pelas técnicas de RMN 1H ^{13}C , IV, UV-vis, condutividade molar e análise elementar (CHN). Os dados de análise elementar são condizentes com a estrutura proposta. A condutividade molar dos complexos indicou se tratar de complexos catiônicos 1:1 estáveis no solvente dimetilsulfóxido. Pelos espectros de IV foram observados deslocamentos, com relação aos espectros dos ligantes livres, nos números de onda característicos aos estiramentos $\nu C=N$ e $\nu C=O$, indicando a possível coordenação dos ligantes semicarbazona à prata(I) através dos átomos doadores de N e O. Com os ensaios de viabilidade celular (MTT) realizados frente à células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e células tumorais e não tumorais de próstata (PNT2 e DU-145), verificou-se maior ação inibitória dos complexos contendo ligantes trifenilfosfina (BAP e CAP) em comparação aos bisquelatos e o complexo BBA apresentou o maior valor de IS ($IC_{50}[PNT2]/IC_{50}[DU-145]$) para as células de próstata avaliadas (IS = 3,13). Os ensaios de interação com o DNA indicaram interações de natureza fraca ou ausência de interações entre os complexos e o DNA, sugerindo o envolvimento de um alvo terapêutico diferente. A avaliação quanto a ação antibacteriana dos compostos demonstrou que o complexo CAP apresenta-se como um promissor agente antimicrobiano, com inibição acima de 70% tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas.

Palavras chave: Prata, compostos de coordenação, câncer, bactéria

ABSTRACT

Title: EVALUATION OF BACTERIAL ACTIVITY AND ANTINEOPLASTIC OF NEW Ag(I) COMPLEXES CONTAINING SEMICARBAZONES AND TRIPHENYLPHOSPHINES AS LIGANDS. The present work aimed to evaluate the influence of ligands triphenylphosphine and semicarbazone as a biological potential as silver(I) complexes with the following formula $[Ag(L)(PPh_3)_2]^+$ and $[Ag(L)_2]^+$ (L= ligands: (*E*)-2-((*E*)-3-phenylallylidene)hydrazine-1-carboxamide – CSC and (2*E*)-2-[(3*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-ylidene]-hydrazinecarboxamide – BSC). It was synthesized and characterized 4 new silver(I) complexes: two bis(chelate) $[Ag(CSC)_2]NO_3 = CCA$ and $[Ag(BSC)_2]NO_3 = BBA$; two complexes containing triphenylphosphine and CSC ligands $[Ag(CSC)(PPh_3)_2]NO_3 = (CAP)$ and triphenylphosphine and BSC ligands $[Ag(BSC)(PPh_3)_2]NO_3 = (BAP)$. The characterization of the compounds was performed using NMR 1H ^{13}C , IR, UV-vis, molar conductivity and elemental analysis (CNH). The CHN data exhibited adequate to the proposed structure. The complexes molar conductivity showed they are cationic 1:1 and stable on dimethyl sulfoxide. On the IR spectra, it was observed displacements regarding the free ligands, watching the characteristic stretching wave numbers of $\nu C=N$ and $\nu C=O$, which indicated donating atoms as N and O. Accomplishing cellular viability assays (MTT) against tumoral cells of breast (MDA-MB-231 and MCF7) and non-tumoral and tumoral prostate cells (PNT2 and DU-145). It was verified greater inhibitory action of the complexes containing triphenylphosphine (BAP and CAP) in comparison to the bis(chelates), and the BBA complex showed larger values of IS ($IC_{50}[PNT2]/ IC_{50}[DU-145]$) for the prostate evaluated cells (IS = 3,13). DNA interaction assays showed weak or non-interacting nature with the synthesized complexes and DNA, which suggests that the therapeutic target is another. The evaluation on bacteria inhibition evidenced that CAP complex is a promising antimicrobial agent, with an inhibitory rate higher than 70% such as Gram-positive as Gram-negative bacteria.

Key Words: Silver, coordination compounds, cancer, bacteria

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
2 - Objetivos	12
2.1 - Objetivo geral	12
2.2 - Objetivos específicos.....	12
3 - Material e Métodos	13
3.1 - Reagentes	13
3.2 - Sínteses	13
3.2.1 - Metodologia sintética	13
3.2.1.1 - Síntese dos ligantes BSC e CSC.....	14
3.2.1.2 - Síntese do complexo $[\text{Ag}(\text{BSC})_2]\text{NO}_3$ (BBA) e $[\text{Ag}(\text{CSC})_2]\text{NO}_3$ (CCA)	15
3.2.1.3 - Síntese dos complexos $[\text{Ag}(\text{BSC})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (BAP) e $[\text{Ag}(\text{CSC})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (CAP)	15
3.3 - Determinação do ponto de fusão	16
3.4 - Análise elementar (CHN).....	16
3.5 - Medidas de condutividade molar	16
3.6 - Espectrometria vibracional na região do infravermelho.....	17
3.7 - Ressonância magnética nuclear.....	17
3.8 - Espectrofotometria eletrônica na região do UV-visível.....	17
3.9 - Citotoxicidade	17
3.10 - Interação com DNA	18
3.10.1 - Titulação espectroscópica	18
3.10.2 - Dicroísmo circular (CD).....	19
3.10.3 - Interação com plasmídeo superenovelado	20
3.11 - Teste de inibição de crescimento bacteriano	20
3.11.1 - Padronização das suspensões bacterianas	20
3.11.2 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	21
4 - Resultados e discussão	22
4.1 - Dados dos compostos	22
4.2 - Condutividade molar	23
4.3 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho	23
4.4 - Ressonância magnética nuclear.....	26
4.4.1 - Dados de RMN para o ligante BSC e seus complexos	27
4.4.1.1 - Ligante BSC	27
4.4.1.2 - Complexo BBA	29
4.4.1.3 - Complexo BAP	32

4.4.2 - Dados de RMN para o ligante CSC e seus complexos	36
4.4.2.1 - Ligante CSC	36
4.4.2.2 - Complexo CCA	38
4.4.2.3 - Complexo CAP	41
4.5 - Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível.....	46
4.6 - Estabilidade em solução	49
4.7 - Citotoxicidade	51
4.8 - Interação com DNA	54
4.8.1 - Titulação espectroscópica	55
4.8.2 - Dicroísmo circular (CD)	57
4.8.3 - Interação com plasmídeo superenovelado	60
4.9 - Inibição Bacteriana	61
5 - Considerações finais.....	64
5.1 - Conclusões.....	64
5.2 - Perspectivas Futuras	65
6 - Referências bibliográficas	65

1 - Introdução

A química bioinorgânica é uma área multidisciplinar da ciência, onde se englobam química, biologia e medicina^{1,2}. Nessa área são estudados os comportamentos das metaloproteínas, efeitos de metais no meio biológico, processos biológicos como, mecanismos de interação, transferência de elétrons em proteínas, ativação proteica entre outros^{1,2}.

Desta forma, os íons metálicos são essenciais ao funcionamento do organismo humano. A falta ou excesso desses metais podem causar doenças como, anemia por falta de ferro; doenças ósseas pela carência de cálcio e potássio; deficiências na regulação de hormônios na escassez de zinco e cobre; intoxicação por metais pesados como chumbo e mercúrio, que levam a doenças neurológicas^{2,3}. Um entendimento a nível molecular, e o tratamento destas doenças causadas pelo funcionamento inadequado desses íons metálicos, é um aspecto de extrema importância da área de química bioinorgânica medicinal².

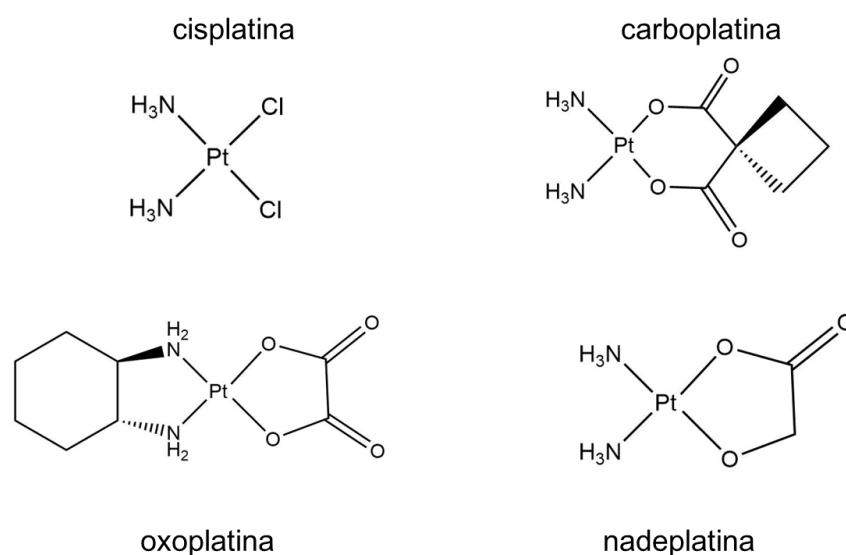
Existem diversos metais e íons metálicos, que são aplicados na medicina moderna para o tratamento de inúmeras doenças. O exemplo mais conhecido na bioinorgânica é a cisplatina, cuja ação antitumoral foi descoberta por Barnett Rosenberg em 1960, que representa um marco na história de compostos baseados em metais para o tratamento de câncer⁴. O mecanismo de ação da cisplatina baseia-se na formação de adutos com o DNA, sendo este o principal alvo citotóxico deste fármaco. Os adutos formados ocorrem principalmente através de ligações covalentes nos grupos guaninas, que impedem a replicação do DNA e a síntese de proteínas, levando a apoptose (morte programada da célula)⁵.

O câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum, mutações no material genético. Por consequência disso, há a ocorrência do mal funcionamento de tecidos, o que pode acarretar na proliferação desordenada dessas células anômalas gerando tumores⁶. Esses tumores podem se desprender do tecido de origem e invadir outros tecidos, esta ocorrência é conhecida como metástase⁶.

O câncer representa a segunda maior causa de mortes no mundo, perdendo apenas para doenças vasculares. Segundo a OMS estima-se que ocorreram 9,6 milhões de mortes em 2018 em decorrência de câncer⁶. O tratamento para esta enfermidade pode se dar através de cirurgia, que consiste na remoção física; quimioterapia, aplicação de fármacos quimioterápicos para inibir ou cessar o crescimento; radioterapia, aplicação de feixes eletromagnéticos de radiação em uma área específica; ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento para obtenção de respostas mais eficazes⁷.

No âmbito de fármacos quimioterápicos empregados em quimioterapia, a cisplatina é extremamente eficaz no tratamento de câncer de ovário e testículo, sendo o fármaco mais recente a apresentar cura acima de 90%^{4,5}. Os efeitos colaterais mais severos do tratamento com cisplatina como nefrotoxicidade (tóxico aos rins), ototoxicidade (tóxico para o ouvido) e neurotoxicidade (tóxico ao sistema nervoso), além da resistência adquirida por algumas linhagens tumorais, abriram portas para o desenvolvimento de novas gerações de complexos de platina, que apresentam menores efeitos colaterais e também tentam sobrepor fatores de resistência. Complexos de platina de segunda e terceira geração, como a carboplatina, oxaloplatina e nadaplatina (FIGURA 1.1), tiveram sua aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) nos EUA a partir de 1985, para uso clínico no tratamento de câncer^{5,8}.

FIGURA 1.1: Estruturas dos complexos de platina aprovados pelo FDA para uso clínico.



Junto ao marco dos fármacos de platina, iniciaram-se os estudos e a busca por novos complexos metálicos com potencial ação biológica não só para o câncer mas também para outras doenças⁴. Embora existam poucos complexos nas prateleiras para o tratamento de câncer, os íons metálicos podem ser aplicados para diversos fins medicinais. Alguns exemplos disso são os complexos de ouro, usados no tratamento de artrite reumatoide e doenças autoimunes^{3,9}; isótopos de tecnécio e rênio, utilizados em diagnósticos por imagem³; antimônio na forma de antimoniato-tertrato de potássio, utilizado no tratamento de pneumonia (Tartar emetic®) e também no tratamento de leishmanioses, como stibogluconato de sódio (Pentosam®)³.

Neste contexto, a prata e seus respectivos complexos já são amplamente conhecidos por apresentarem propriedades anticépticas¹⁰⁻¹². Os complexos de prata já possuem maior número de estudos relacionados a potencial antibacteriano^{11,13}. Ainda são recentes as pesquisas ligadas a ação antitumoral de complexos de prata.

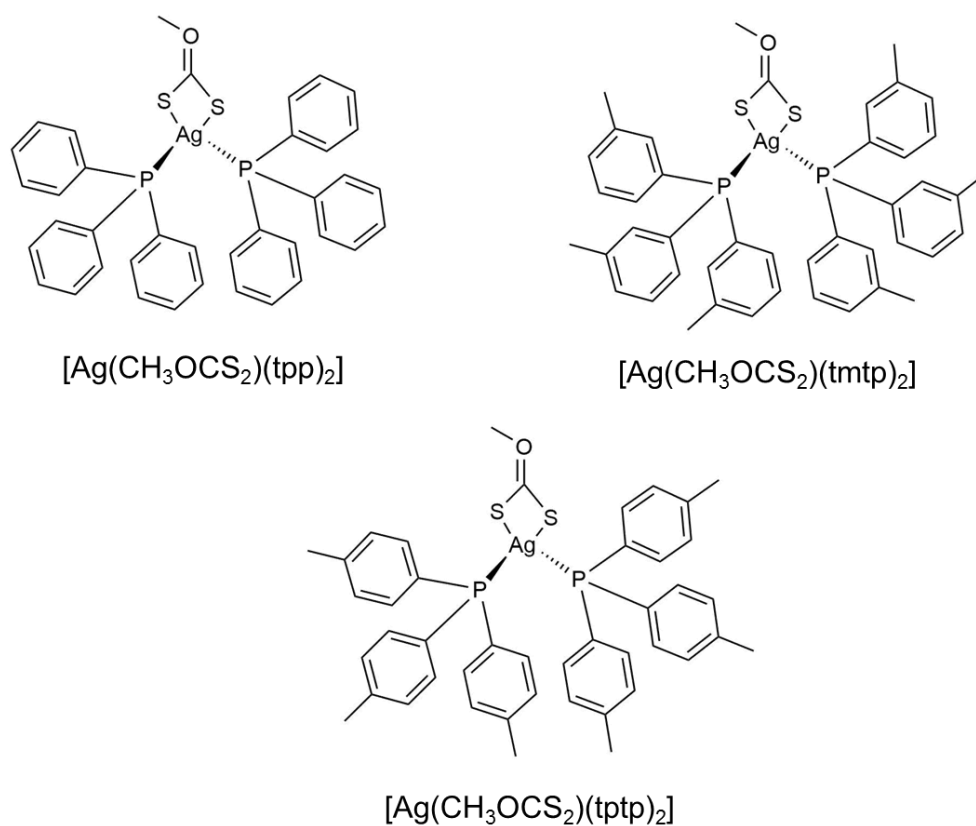
Dentre os metais mais antigos utilizados para fins medicinais pelo homem, a prata se destaca. A prata é um metal de transição do grupo 11 da tabela periódica. Esse metal pode ser encontrado na forma de sulfeto (Ag_2S), cloreto (AgCl) ou como minério, sua forma nativa ou associada a outros metais como cobre, ouro, ferro, níquel e chumbo^{14,15}. É um metal dúctil, maleável e um bom condutor elétrico e térmico¹⁴. Historicamente ela vem sendo utilizada como agente terapêutico na medicina, especialmente em doenças infecciosas.

Os primeiros relatos do uso medicinal da prata datam de 370 a.C¹², com Hipócrates usando preparos com prata no tratamento de úlceras. Em tempos mais recentes Paracelsus também utilizou prata e nitrato de prata no tratamento de feridas, uma prática utilizada até hoje¹².

Em tempos contemporâneos inúmeros compostos de prata vem sendo utilizados em diversas áreas de aplicação. Exemplos comuns são a sulfadiazina de prata, no uso como pomada para feridas e queimaduras na pele¹⁶; nanopartículas de prata (AgNP) aplicadas em curativos na medicina^{13,17}; desodorantes contendo AgNP para inibir bactérias causadoras de maus odores^{17,18}; cosméticos; roupas esportivas^{19,20}; dentre outros produtos.

Diversos trabalhos reportados na literatura^{16,21-25}, demonstram o potencial farmacológico de complexos de prata na inibição de linhagens de células tumorais. Banti, C. N. *et al.*²⁶ apresentaram o potencial citotóxico de cinco complexos de prata com ligante metil-xantato e trifenílfosfinas. Neste estudo foram avaliados os valores de IC₅₀ (concentração de um composto em que são inibidos 50% da viabilidade de uma população celular) em duas linhagens de células de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. Os valores observados para a linhagem MCF-7 variaram de 0,7 a 5,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, que foram em sua maioria menores do que os valores do fármaco padrão, cisplatina (5,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)²⁶. Isso mostra que esses complexos possuem grande potencial inibitório para essa linhagem. Enquanto que para a linhagem MDA-MB-231 não apresentaram atividade²⁶. Na FIGURA 1.2 estão apresentados os complexos sintetizados por Banti, C. N. *et al.*

FIGURA 1.2: Complexos de prata com atividade antitumoral, sintetizados por Banti, C. N. *et al.*²⁶

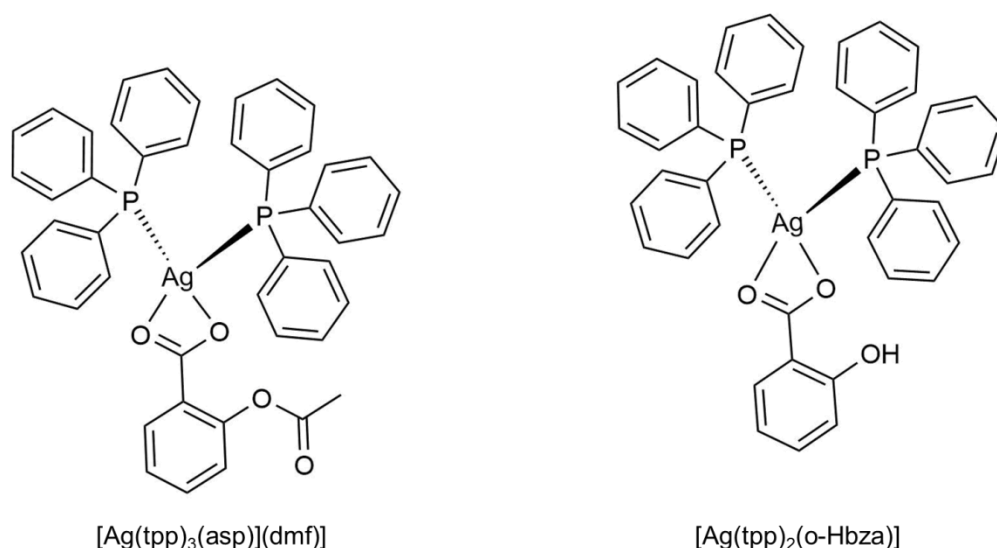


* ttp = trifenílfosfina; tptp = tri(*p*-toluíl)fosfina; tmtp = tri(*m*-toluíl)fosfina.

Outro estudo, feito por Poyraz M. *et al.*²⁷, verificou a atividade de complexos de prata, também com ligantes trifenílfosfina (tpp), ácido

hidroxibenzoico (o-Hbza) e ácido acetilsalicílico (aspH), frente à linhagem tumoral LMS (câncer muscular) e MCF-7 (câncer de mama). Foram verificados os valores de IC₅₀ entre 1,5 a 3,7 µmol·L⁻¹ para as duas linhagens tumorais, enquanto que para o fármaco padrão (cisplatina), foi de 25 µmol·L⁻¹. Na FIGURA 1.3 pode-se observar grande similaridade estrutural entre estes complexos e os complexos reportados no trabalho anterior (Banti C. N *et al.*).

FIGURA 1.3: Complexos de prata com atividade antitumoral, sintetizados por Poyraz M. *et al.*²⁷



Assim como o câncer, um problema de saúde pública que vem aumentando drasticamente nas últimas décadas são as infecções e mortes causadas por microrganismos, principalmente bactérias, que adquirem resistência à antibióticos²⁸. As bactérias são microrganismos unicelulares procariotos, ou seja, possuem estrutura simples, com seu material genético espalhado pelo citoplasma e uma membrana celular protegida por uma parede bacteriana²⁹.

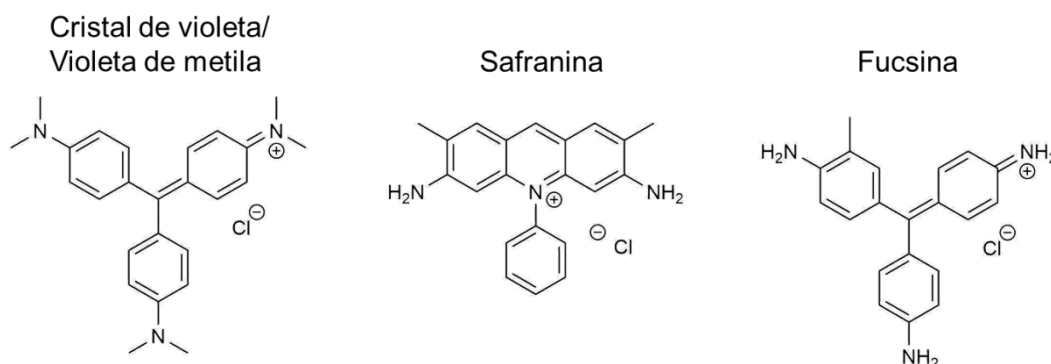
O mecanismo de resistência das bactérias à fármacos funciona em uma linha sequencial de tentativa de eliminação no momento de entrada da droga, acumulação, ligação a essa droga e diminuição de sua ação³⁰. Esses mecanismos são codificados por mudanças no material genético, variando de mutações pontuais, por meio da assimilação de genes resistentes preexistentes, à importação de genes presentes no ambiente, deixados por microrganismos que morreram por estresse ao fármaco³⁰.

As consequências geradas por microrganismos resistentes a antibióticos e diversos medicamentos, são extremamente sérias e podem levar a impactos significativos na mortalidade e economia de uma região³¹. Pacientes infectados por doenças causadas por esses tipos de microrganismos estão correndo maior risco de vida. Em hospitais, os custos para se tratar esses pacientes fica excessivamente mais caro³¹.

Só nos Estados Unidos, anualmente, são reportados pelo menos 2 milhões de infecções causadas por microrganismos com multirresistência a medicamentos, com 23.000 mortes e um impacto na economia na faixa de 55-70 bilhões de dólares³¹. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), monitoram as unidades de tratamento intensivo (UTIs) em mais de 1500 hospitais no território nacional^{32,33}. Em um boletim publicado pela ANVISA em 2015, mostrou que o número de infecções por microrganismos só em UTIs foi de 22.500 no ano^{32,33}.

Existem milhares de espécies de microrganismos que podem causar infecções, porém eles podem ser classificados em dois grupos, bactérias do tipo Gram-positivo e do tipo Gram-negativo. O método de Gram é um método colorimétrico no qual possibilita diferenciar bactérias pelas características químicas e físicas das estruturas da parede bacteriana, dependendo da coloração que adquirem após o tratamento ³⁴. As bactérias Gram-positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano na sua parede, na qual retém o agente colorimétrico, cristal de violeta (FIGURA 1.4) é retido nas etapas de lavagem ³⁵. Bactérias Gram-negativas possuem sua camada de peptidoglicano mais fina, o que permite o cristal de violeta ser removido na etapa de lavagem³⁵. Elas são coloridas por contra indicadores rosas ou vermelhos como safranina ou fucsina (FIGURA 1.4) ^{35,36}.

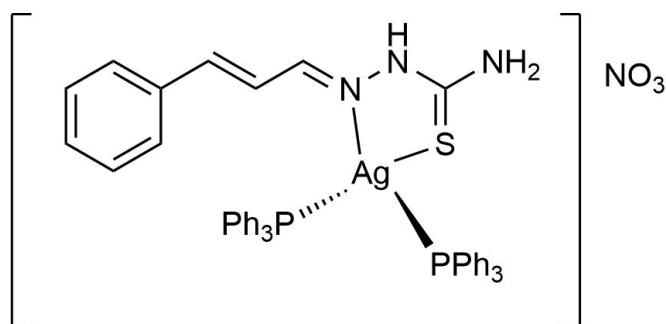
FIGURA 1.4: Estruturas dos agentes colorimétricos usados no método de Gram.



Com o aumento nos números de infecções por microrganismos resistentes a antibióticos, a organização mundial de saúde (OMS / WHO) desenvolveu o plano de ação global contra a resistência antimicrobiana³⁷. Que consiste em reforçar a continuidade de tratamentos eficazes, prevenir novas infecções, e garantir que medicamentos sejam acessíveis e utilizados de maneira responsável³⁷. Desta forma se faz necessário melhorar o conhecimento e conscientização sobre o assunto, otimizar o uso de antibióticos já existentes, pesquisar e desenvolver novos medicamentos mais eficazes^{37,38}.

Nesse segmento, os estudos de complexos de prata são uma importante parcela no desenvolvimento de novos fármacos com propriedades de inibição microbiana. A prata já é amplamente conhecida por ser um metal com propriedades anticépticas, e já possui maior número de estudos em relação à atividade antibacteriana¹⁰⁻¹³.

Estudos feitos por Khalaji A. D. *et al*⁸⁹, apresentam a síntese e estudos de inibição bacteriana de um complexo de prata com ligantes tiossemicarbazona e trifenilfosfina (FIGURA 1.5). Nesse estudo foram testadas quatro linhagens de bactérias sendo duas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e duas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) frente aos ligantes livres e o complexo sintetizado.

FIGURA 1.5: Estrutura do complexo $[Ag(catsc)(PPh_3)_2]NO_3$ 

O experimento de inibição mostrou que o ligante livre não possui atividade inibitória frente às linhagens testadas, com valor de concentração inibitória mínima (CIM) acima de $4,67 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Já o complexo não mostrou atividade frente à *P. aeruginosa* com valor de CIM acima de $556 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, porém se mostrou ativo na inibição das outras linhagens, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*. Na TABELA 1.1 estão os listados os valores de CIM para as linhagens testadas.

TABELA 1.1: Valores de CIM para o ligante livre (catsc) o complexo $[Ag(catsc)(PPh_3)_2]NO_3$.

Linhagem bacteriana	CIM do complexo $[Ag(catsc)(PPh_3)_2]NO_3$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CIM do ligante livre (catsc) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>E. faecalis</i>	60	>500
<i>S. aerus</i>	<1	>500
<i>E. coli</i>	<1	>500
<i>P. aeruginosa</i>	>500	>500

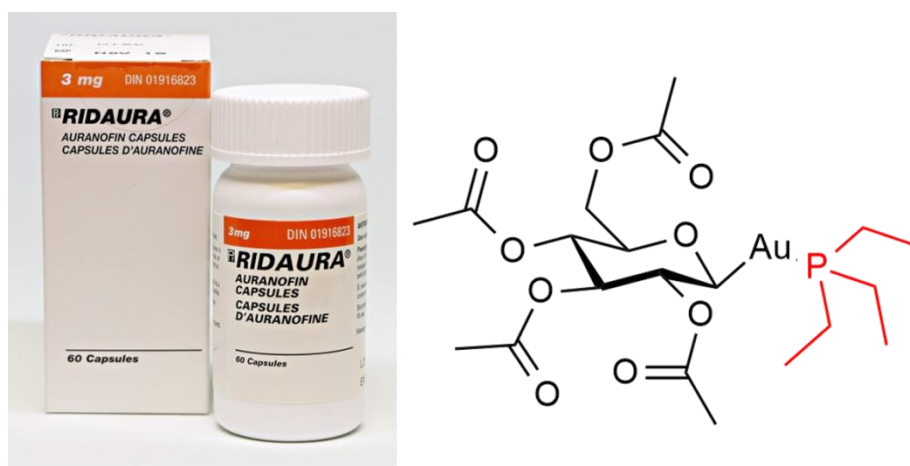
Vale ressaltar que a *P. aeruginosa*, é uma linhagem de bactéria Gram-negativa, com alta capacidade de gerar resistência a fármacos³¹, estando na lista de patógenos com prioridade crítica da OMS, para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos⁴⁰.

Os ligantes fosfínicos (PPh_3) são moléculas com grande interesse bioquímico, por apresentarem caráter π -acceptor e σ -doador, o que pode ser fortalecida pela ligação metal-fósforo e retrodoação de densidade eletrônica dos orbitais d , do metal, para os orbitais d vazios do fósforo⁴¹. Além disso,

quando coordenadas ao centro metálico tendem a aumentar a lipofilicidade do complexo formado, o que permite maior permeação da membrana celular em meio biológico⁴¹.

Já existem compostos derivados de fosfinas com uso aprovado para tratamentos clínicos, como é o caso da auranofina^{42,43}, que é um complexo de ouro com ligante trietilfosfina e tiol (FIGURA 1.6), utilizado no tratamento de artrite reumatoide⁴⁴. Também possui estudos promissores na inibição do vírus do HIV^{9,44,45}.

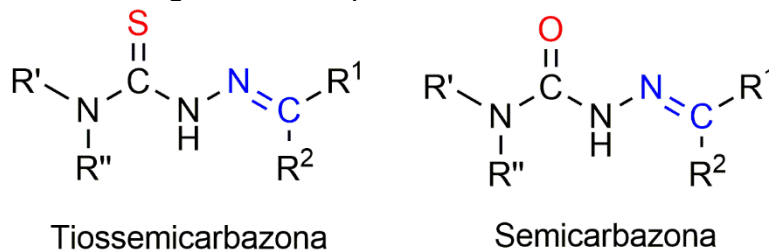
FIGURA 1.6: Estrutura do fármaco auranofina.



Os estudos de Khalaji, previamente mencionados, também mostram um composto derivado de trifenilfosfina, com atividade inibitória frente à bactérias³⁹. Esses estudos são apenas uma amostra, que indicam a pluralidade em que compostos derivados de fosfinas possuem na área de bioinorgânica medicinal.

Ligantes da classe de tiossemicarbazonas e semicarbazonas tem sido extensivamente explorados para o desenvolvimentos de novos complexos metálicos em função das propriedades químico-estruturais e biológicas que estes compostos apresentam⁴⁶. A FIGURA 1.7 abaixo apresenta a estrutura geral de compostos tiossemicarbazonas e semicarbazonas onde, estruturalmente estes compostos diferenciam-se por apenas um átomo; as tiossemicarbazonas apresentam um átomo de S (grupo tioamida), enquanto que as semicarbazonas apresentam um átomo de O (grupo amida)^{47,48}.

FIGURA 1.7: Estrutura geral de compostos tio e semicarbazonas.



$\text{R}', \text{R}'', \text{R}^1, \text{R}^2 = \text{alquil, aril, H.}$

Pela grande similaridade estrutural, tanto os compostos tiosemicarbazonas quanto os semicarbazonas podem ser obtidos da mesma maneira. Comumente estas moléculas são sintetizadas a partir de uma reação de adição regioseletiva seguida de condensação entre um aldeído ou cetona e uma tio/semicarbazida⁴⁸⁻⁵⁰. Com exceção da molécula de água que é liberada, tem-se a formação exclusiva do composto tio/semicarbazona específico, atribuindo grandes rendimentos para esta reação além de estar de acordo com aspectos da química verde, como a economia de átomos e a não liberação de subprodutos tóxicos⁴⁸⁻⁵⁰.

Como pode-se observar na estrutura geral destas moléculas (vide FIGURA 1.7), estas apresentam-se como compostos bastante versáteis onde pode-se combinar diferentes aldeídos ou cetonas a diferentes semi/tiosemicarbazonas. Por esta característica, tem-se a possibilidade de obtenção de diferentes ligantes com distintos modos de coordenação^{48,51}. No caso específico de semicarbazonas, estas podem coordenar-se a centros metálicos através dos átomos de oxigênio do grupo amida, de nitrogênio da ligação C=N além de outros átomos doadores que possam estar contidos na porção do aldeído ou cetona. Estes pontos de coordenação são caracteristicamente sítios duros (O) e intermediários (N), e a posição destes grupos propicia a formação de anéis quelatos de 5 e 6 membros, que atribuem grande estabilidade aos complexos metálicos formados^{48,52}.

Comprovadamente, compostos tio e semicarbazonas apresentam ação antitumoral, antifúngica, antibacteriana, dentre outras⁴⁸. Ainda o mecanismo de ação biológica proposto para estes compostos envolve seus complexos metálicos.

Assim, considerando as propriedades antitumorais e antibacterianas de complexos de Ag e as características biológicas e químico/estruturais de ligantes fosfínicos e semicarbazonas, no presente trabalho propõem-se a investigação biológica de complexos de Ag bisquelatos ou não contendo ligantes trifenilfosfina e semicarbazonas.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Avaliar a influência de ligantes semicarbozonas e trifenilfosfina na esfera de coordenação do íon prata(I) na atividade frente a linhagens de bactérias e células tumorais.

2.2 - Objetivos específicos

- Sintetizar complexos de prata(I) contendo ligantes trifenilfosfina, benzalacetona-semicarbazona e cinamaldeído-semicarbazona.
- Caracterizar os compostos obtidos pelas técnicas de IV, RMN, UV-vis, análise elementar e condutividade molar.
- Investigar a ação citotóxica frente a células tumorais de mama e pulmão com a determinação da concentração inibitória mínima (IC₅₀) por meio de ensaios de viabilidade celular (MTT).
- Investigar a concentração inibitória mínima (CIM) frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3 - Material e Métodos

3.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados não tiveram tratamento prévio e estão descritos na TABELA 3.1.

TABELA 3.1: Reagentes e suas respectivas procedências

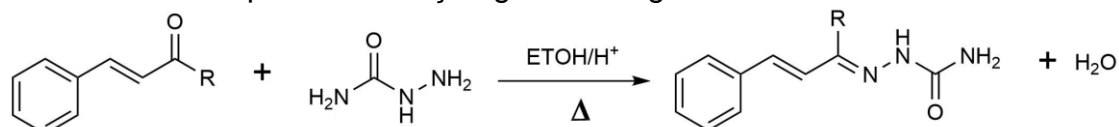
Reagente	Procedência
Acetonitrila P.A.	Synth
Benzalacetona ($\geq 97\%$)	Fluka
Cinamaldeído (98%)	Sigma-Aldrich
Cloridrato de semicarbazida (98%)	Sigma-Aldrich
DMSO-d ₆	Sigma-Aldrich
DMSO P.A.	Synth
Etanol P.A.	Synth
Metanol P.A.	Synth
Trifenilfosfina (99%)	Sigma-Aldrich

3.2 - Sínteses

3.2.1 - Metodologia sintética

Para a síntese dos ligantes foi utilizada metodologia adaptada da literatura^{49,53}, no qual usou-se HCl 0,8 mol·L⁻¹ como catalisador para a reação de condensação. Na FIGURA 3.1 é apresentado o esquema de reação geral para a síntese dos ligantes.

FIGURA 3.1: Esquema de reação geral dos ligantes sintetizados.



R = CH₃ ou H
 H⁺ = HCl 0,8 mol·L⁻¹

Para a síntese dos complexos de prata(I) seguiu-se metodologia da literatura³⁹ alterando condições de reação como tipo e proporção de solvente. Na FIGURA 3.2 é mostrado o esquema de reação para a síntese dos

complexos bisquelatos e na FIGURA 3.3 o esquema de síntese para os complexos contendo ligante trifenilfosfina.

FIGURA 3.2 Esquema de reação para a síntese dos complexos bisquelatos.

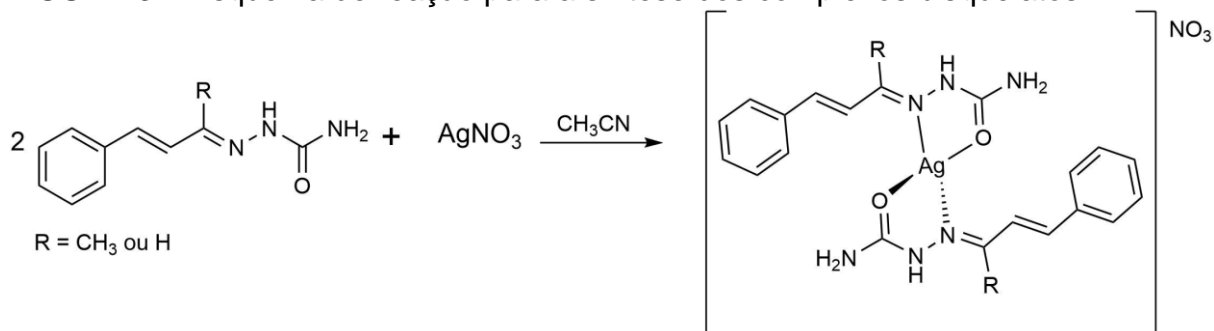
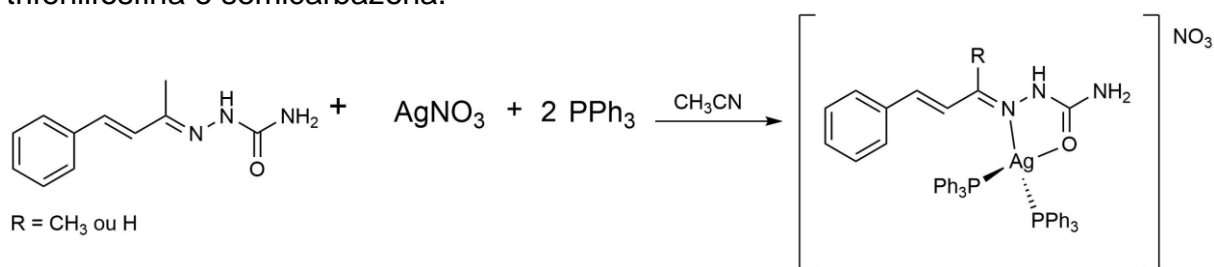


FIGURA 3.3: Esquema de reação para a síntese dos complexos derivados de trifenilfosfina e semicarbazona.



3.2.1.1 - Síntese dos ligantes BSC e CSC

Em balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 0,50 g de benzalacetona (3,7/ mmol) / 0,46 mL de cinamaldeído (3,7 mmol) e solubilizados em 40 mL de etanol. Com uma pipeta de Pasteur foram adicionadas 3 gotas de HCl 0,8 mol·L⁻¹ e os sistemas colocados em agitação. Em seguida foram adicionados 0,41 g de cloridrato de semicarbazida (3,7 mmol). A reação de condensação foi mantida em refluxo por 24 horas. Ao término da reação a suspensão foi resfriada em banho de gelo e os produtos sólidos foram isolados por filtração a vácuo. Os sólidos foram lavados com água destilada gelada e seco à vácuo. Foram obtidos 0,58 g de BSC com rendimento de 65% e 0,56 g de CSC com rendimento de 63%.

3.2.1.2 - Síntese do complexo $[\text{Ag}(\text{BSC})_2]\text{NO}_3$ (**BBA**) e $[\text{Ag}(\text{CSC})_2]\text{NO}_3$ (**CCA**)

Em erlenmeyers separados de 125 mL protegidos de luz, contendo 0,100 g (0,49 mmol) de BSC solubilizados em 10 mL de etanol, e 0,100 g de CSC (0,53 mmol) solubilizados em 20 mL de acetonitrila, foram adicionados 0,051 g (0,29 mmol) e 0,044 g (0,26 mmol) de AgNO_3 respectivamente. A reação foi mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente. Após um período de 8 horas foi observada a formação de precipitado. As suspensões foram filtradas a vácuo e os sólidos foram lavados com água destilada gelada. Os sólidos foram secos à vácuo e a massa do complexo BBA seco obtida foi de 0,135 g, com um rendimento de 90% e para o complexo CCA a massa seca foi de 0,137 g com rendimento de 95%.

3.2.1.3 - Síntese dos complexos $[\text{Ag}(\text{BSC})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (**BAP**) e $[\text{Ag}(\text{CSC})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (**CAP**)

Em um Erlenmeyer de 125 mL (1), protegido de luz, contendo 0,083 g (0,49 mmol) de AgNO_3 solubilizados em 20 mL de acetonitrila, foi adicionado 0,260 g de trifetilfosfina (0,98 mmol). Em um segundo Erlenmeyer também protegido de luz (2), contendo 0,089 g de AgNO_3 (0,52 mmol) e solubilizados em uma mistura 1:1 metanol/acetonitrila, foi adicionado 0,274 g de trifetilfosfina (1,04 mmol). Os dois sistemas foram colocados sob agitação, em seguida foram adicionados 0,100 g de BSC (0,49 mmol) à solução (1) e 0,100 g de CSC (0,52 mmol) à solução (2).

As reações foram mantidas em agitação por 8 horas em temperatura ambiente. Após esse período, as suspensões foram rota-evaporadas até a precipitação dos produtos. Os dois sólidos apresentaram coloração branca e foram lavados com água destilada gelada e secos a vácuo. A massa seca para BAP foi de 0,420 g, com rendimento de 95% e a massa seca para CAP foi de 0,439 g com rendimento de 94,6%.

3.3 - Determinação do ponto de fusão

As medidas do ponto de fusão foram realizadas no equipamento MARCONI NA 301. Após a compactação da amostra macerada em um capilar fechado, o sistema foi aquecido em uma razão de 1 °C/min, sendo a temperatura máxima alcançada de 350°C.

3.4 - Análise elementar (CHN)

As análises elementares foram feitas no equipamento *Fision* da CE instruments, modelo CE1108 (CHNS-O) EAGER 200 – RESULTS. A responsável pela análise foi Luciana Visoto técnica do departamento de química da UFSCar. O método empregado para análise foi CHNS1904, utilizando um padrão de sulfanilamida para calibrar o equipamento com erro médio de $\pm 0,05$ para porcentagem de carbono; $\pm 0,18$ para porcentagem de hidrogênio; e $\pm 0,09$ para porcentagem de nitrogênio.

3.5 - Medidas de condutividade molar

As análises de condutividade molar foram executadas em DMSO com o uso do condutímetro MARCONI modelo MA 521 do grupo de laboratório LERCI (Laboratório de estrutura e reatividade de compostos inorgânicos) do departamento de química da UFSCar. O experimento foi realizado em triplicata, onde foram feitas soluções dos compostos em concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A média simples dos valores de condutividade foi utilizada como resultado. O solvente DMSO foi utilizado como branco e em seguida foi realizada a leitura de condutividade das amostras. As medidas foram realizadas em tempos de 0, 24 e 48 horas para verificar a estabilidade dos compostos no solvente em questão.

3.6 - Espectrometria vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram obtidos no espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100, usando pastilhas de KBr como suporte. Utilizou-se o modo de 32 varreduras na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os dados obtidos foram tratados utilizando os softwares Shimadzu IR Solution, 1.60, e Origin 8.0.

3.7 - Ressonância magnética nuclear

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (RMN) foi utilizado o espectrômetro BRUKER ARX 9,4T do Departamento de Química (DQ) da UFSCar. Todos os espectros foram obtidos em DMSO- d_6 e os dados foram tratados utilizando-se o programa MestReNova 6.0.2-5475. O espectro de RMN ^{31}P foi feito logo após a ressonância de ^1H , e a medida foi realizada na mesma solução deuterada.

3.8 - Espectrofotometria eletrônica na região do UV-visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. O experimento foi realizado em triplicata e a linha base foi feita em DMSO. Foram utilizadas soluções com concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para cada um dos compostos. Cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm foram utilizadas para obtenção dos espectros e, em seguida, foi feita a varredura na região de 1100 a 190 nm.

3.9 - Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as linhagens celulares: MDA-MB-231 (câncer de mama); PNT2 (células de próstata não tumoral); DU145 (câncer de próstata). As linhagens celulares PNT2 e DU145 foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de FBS (soro fetal bovino), já a linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) com 10% de FBS. Todas as linhagens foram armazenadas

dentro de garrafas de plástico (Corning) e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

A contagem das células foi realizada utilizando o corante Azul de Tripano em uma câmara de Neubauer. Após a contagem foram adicionadas às placas de 96 poços alíquotas com 150 µL contendo 1,5x10⁴ células mL⁻¹. As placas foram mantidas por 24 horas em estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 µL de uma solução de DMSO contendo os ligantes ou os complexos. As concentrações finais nos poços foram de 0,8, 1,58, 3,16 6,25, 12,5, 25, 50, 100 µmol·L⁻¹. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48 horas^{54–56}.

Após a incubação das microplacas foi adicionado 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 incubada novamente na estufa por 4 horas. Por fim, foi retirada a solução de cada poço e adicionou-se 100 µL de álcool isopropílico, em seguida foram realizadas as medidas de absorbância em cada poço com o leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 2010 e GraphPadPrism 6.01.

3.10 - Interação com DNA

3.10.1 - Titulação espectroscópica

O experimento de titulação espectroscópica foi realizado em parceria por Renan Lira, aluno de doutorado do professor Dr. Adelino G. V. Netto da UNESP – Araraquara – Grupo de Compostos de Coordenação e Organometálicos. A solução de CT-DNA (Calf Thymus DNA) foi obtida pela solubilização de aproximadamente 10 mg da biomolécula em 5 mL de uma solução tampão Tris-HCl (5 mmol·L⁻¹ Tris HCl e 50 mmol·L⁻¹ de NaCl, pH 7,4). Os espectros de UV-vis foram obtidos para os complexos em quantidades crescentes de solução de CT-DNA, na região de 190 a 1100 nm. A titulação foi realizado a 25 °C, onde a concentração dos complexos foi mantida fixa em 20 µmol·L⁻¹, enquanto que a concentração do CT-DNA variou de 0 a 60 µmol·L⁻¹⁵⁷.

Partindo-se de uma solução do complexo em DMSO com concentração de $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, foram adicionados $60 \mu\text{L}$ do composto em $2940 \mu\text{L}$ de tampão tris-HCl (pH 7,4), em uma cubeta de quartzo de 3 mL . A medida do branco foi feita com $60 \mu\text{L}$ de DMSO e $2940 \mu\text{L}$ de tampão tris-HCl (pH 7,4). Assim, após a primeira leitura do complexo em ausência de DNA, foram adicionados $18 \mu\text{L}$ de uma solução de DNA com concentração de $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, tanto na cubeta contendo o complexo quanto no branco. Foram feitas adições sucessivas de $18 \mu\text{L}$ da solução de DNA, tanto no branco quanto no complexo, completando um total de 10 adições. A proporção molar entre complexo e DNA variou de 0,3 a 3,0 com intervalos de 0,3 em cada adição.

A constante de ligação (K_b) foi obtida pela equação de Benesi-Hildebrand, na seguinte forma:

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} \times \frac{1}{K_b[\text{DNA}]}$$

Segundo a equação, A_0 e A representam as absorvâncias do complexo em ausência e presença de DNA, respectivamente. Os coeficientes ϵ_G e ϵ_{H-G} são coeficientes de absorvância molar do complexo livre e do complexo-DNA, respectivamente. Desta forma o valor da constante (K_b) foi calculado pela razão entre o coeficiente linear e o angular obtidos a partir de um gráfico de $A_0/(A-A_0)$ em função de $1/[\text{DNA}]$ ^{58,59}.

3.10.2 - Dicroísmo circular (CD)

O experimento de dicroísmo circular foi realizado em parceria por Renan Zanetti, aluno de doutorado do professor Dr. Adelino G. V. Netto da UNESP – Araraquara – Grupo de Compostos de Coordenação e Organometálicos.

Os espectros de CD foram registrados utilizando uma cubeta de quartzo de 3 mL , na faixa de 235 a 320 nm , com acúmulo de 5 scans, largura de banda de $1,0 \text{ nm}$, velocidade de $100 \text{ nm}/\text{min}$ e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ^{60,61}. Assim foram registrados espectros de CD das amostras de DNA em presença de quantidades crescentes dos complexos, onde a concentração de DNA foi

mantida fixa em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e concentração do complexo foi variada de 0 a $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Primeiramente foi preparado 20 mL de uma solução de DNA $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão tris-HCl (pH 7,4). Esta solução foi distribuída em 6 tubos de ensaio e foram feitas adições crescentes do complexo em estudo, partindo-se de uma solução em DMSO com concentração de $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Estas amostras foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h e, após este período, as leituras foram realizadas em um espectrômetro Jaco J-815.

3.10.3 - Interação com plasmídeo superenovelado

Em uma solução tampão Tris-HCl ($1 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH: 7,0) foram adicionados $0,5 \mu\text{L}$ do plasmídeo pBR322 e $1 \mu\text{L}$ dos complexos metálicos em DMSO, em diferentes concentrações, totalizando um volume final de ensaio de $20 \mu\text{L}$. A solução final foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas⁵⁴. Após o tempo de incubação as amostras foram retiradas do banho termostático e adicionou-se $15 \mu\text{L}$ de STEB (40% de sacarose, $100 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris-HCl, pH = 7,5, $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDTA, $0,5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azul de bromofenol) às amostras, em seguida foi realizada a centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ das soluções foram adicionados no gel de agarose 1% (m/v). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 20 V durante 12h, após este 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.

3.11 - Teste de inibição de crescimento bacteriano

3.11.1 - Padronização das suspensões bacterianas

O experimento de inibição de crescimento bacteriano foi realizado em parceria com o grupo de pesquisa do professor Dr. Saulo Santesso Garrido do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química -

UNESP – Arararquara. Todos os ensaios e resultados obtidos foram feitos pela doutoranda Carolina R. Zambom.

As suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 e *Salmonella tify* ATCC 6539 foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em Caldo Muller Hinton (CMH), adicionando-se meio de cultura estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de microorganismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

3.11.2 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A porcentagem de inibição foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006)⁶². Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH. Em seguida foram acrescentados 100 µL dos compostos CAP, BAP, BBA, CCA, CSC e BSC, previamente solubilizados em solução aquosa contendo 5% de DMSO, e realizada a diluição seriada de 160 µM até 0,09 µM. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos microorganismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico Ciprofloxacino na concentração inicial de 160 µM, esta foi usada visando alcançar a CIM, sendo considerada como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e o controle da solução de 5% DMSO. As microplacas foram encubadas em estufa microbiológica à temperatura de 37 °C durante 24 horas e em seguida foram lidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Dados dos compostos

Os ligantes sintetizados junto com os complexos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas descritas na metodologia. Os dados de ponto de fusão e decomposição dos compostos obtidos são apresentados na TABELA 4.1. Os valores de análise elementar (CHN) tanto dos ligantes quanto dos complexos são apresentados na TABELA 4.2.

TABELA 4.1: Dados de ponto de fusão e ponto de ebulição dos compostos.

Composto	Coloração	Ponto de fusão (°C)	Ponto de decomposição (°C)
BAP	Branco	178 - 181	266 – 270
BBA	Branco	162 - 178	228 – 238
CCA	Branco	183 - 186	240 – 245
CAP	Branco	195 - 197	199 – 203
CSC	Amarelo claro	217 - 220	-*
BSC	Amarelo claro	186 - 190	-*

* Pontos de decomposição não observados pela faixa máxima do equipamento

TABELA 4.2: Valores experimentais (Exp.) e teóricos (Teor.) para análise elementar dos compostos sintetizados.

Código	Fórmula	%C Exp.	%C Teor.	%H Exp.	%H Teor.	%N Exp.	%N Teor.
(CSC)	$C_{10}H_{11}N_3O$	63,33	63,48	6,74	5,86	22,45	22,21
(BSC)	$C_{11}H_{15}N_3O \cdot \frac{1}{2}H_2O$	63,07	63,14	7,17	6,58	20,39	20,68
(BBA)	$C_{22}H_{26}AgN_6O_2 \cdot 2H_2O$	43,57	43,15	4,68	4,94	15,19	16,01
(BAP)	$C_{47}H_{43}AgN_4O_4P_2 \cdot 2H_2O \cdot CH_3CN$	60,81	60,38	4,29	5,17	7,26	7,18
(CCA)	$C_{20}H_{22}AgN_6O_2$	43,43	43,81	4,04	4,18	17,70	17,88
(CAP)	$C_{45}H_{42}AgN_4O_4P_2 \cdot \frac{1}{2}(CH_3CN \cdot H_2O)$	61,94	61,82	4,80	4,80	6,98	6,90

Na TABELA 4.1 os valores de ponto de fusão dos complexos obtidos foram mais baixos do que os valores de ponto de fusão dos ligantes livres. Este fato pode estar relacionado a presença de interações intermoleculares de natureza mais fraca dos complexos em relação aos ligantes. Como observado na TABELA 4.2, as porcentagens experimentais se aproximam dos valores teóricos, mostrando que a proposta estequiométrica está condizente com o que foi encontrado. Para os compostos BSC, BBA, BAP e CAP foram considerados solventes nas porcentagens experimentais, os quais foram utilizados nas

sínteses, lavagem e purificação. A presença desses solventes, pode ser constatada nos experimentos de RMN e IV.

4.2 - Condutividade molar

A condutividade dos compostos foi feita em DMSO, para se avaliar a formação de complexos neutros ou catiônicos. Os dados registrados pelo experimento são apresentados na TABELA 4.3.

TABELA 4.3: Dados de condutividade molar para os complexos sintetizados.

$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$				
CAP	BBA	BAP	CCA	Eletrólito
75,1	56,3	37,0	76,1	1:1

Dados da literatura^{63,64} mostram que, complexos eletrólitos 1:1, a faixa de condutividade molar esperada é de 20 a 75 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$. Como pode se observar na TABELA 4.3, todos os complexos sintetizados apresentaram condutividade molar que condiz com a faixa de eletrólitos 1:1.

Uma vez que se espera que o íon nitrato esteja presente como contraíon no complexo, isso indica que os ligantes não sofreram desprotonação durante a coordenação. Pode-se salientar também que todos os complexos permaneceram estáveis em solução em todas as medidas de tempo.

4.3 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma importante técnica na caracterização de compostos de coordenação. Essa técnica fornece informações em termos de vibrações das ligações entre átomos e moléculas de uma determinada substância⁶⁵. Os dados vibracionais apresentam-se na forma de bandas, onde cada grupo funcional possui uma vibração característica em uma determinada região do espectro^{65,66}.

É possível diagnosticar a presença de bandas conhecidas de um composto de coordenação, sendo capaz de indicar se houve a ocorrência da

coordenação ou não, pelas mudanças nos números de onda (cm^{-1}) de bandas características dos ligantes em questão^{65,66}. A radiação infravermelha representa a porção do espectro eletromagnético que se situa entre as regiões do visível e micro-ondas, que possui faixa entre 14290 e 200 cm^{-1} (⁶⁵⁻⁶⁷).

Nos compostos sintetizados as bandas diagnósticas como a do estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ aparecem de forma fina e intensa na região de 1500 – 1750 cm^{-1} . Outra banda de diagnóstico importante, é a do estiramento $\nu\text{C}=\text{N}$ que ocorrem em 1500 – 1600 cm^{-1} . Uma variação no número de onda dessas bandas é um indício de que houve a coordenação dos átomos doadores, presentes nestes grupos funcionais, ao centro metálico^{67,68}.

Os espectros vibracionais do ligante BSC e de seus respectivos complexos estão representados na FIGURA 4.1 e na TABELA 4.4. Já os dados para o ligante CSC e seus respectivos complexos estão dispostos na FIGURA 4.2 e na TABELA 4.5.

FIGURA 4.1: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante BSC e seus respectivos complexos.

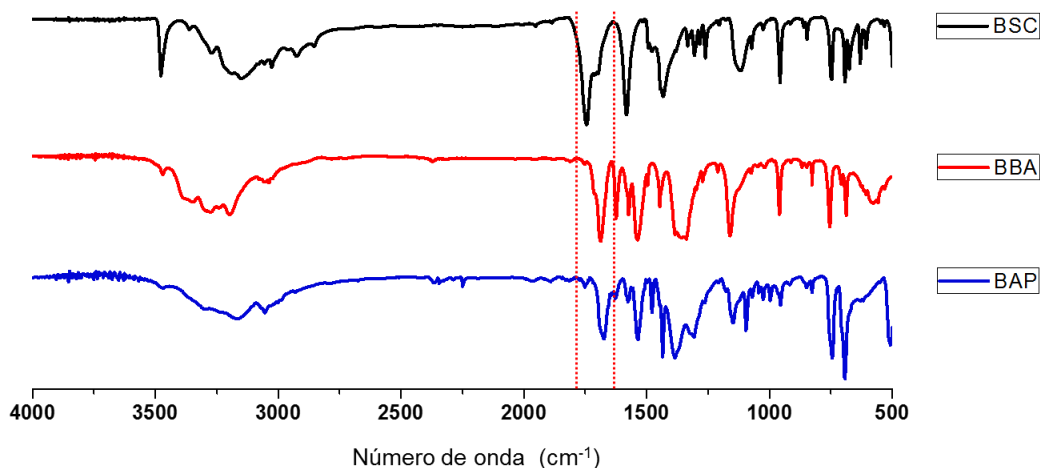


TABELA 4.4: Dados de infravermelho das bandas diagnóstico para o ligante BSC e de seus respectivos complexos (Vide FIGURA 4.1).

Atribuição	BSC (cm ⁻¹)	BBA (cm ⁻¹)	BAP (cm ⁻¹)
δ C–H aromático	746	748	746
δ C=C	956	958	956
ν P–C	-	-	1095
ν NO ₃ ⁻	-	1343 – 1384	1350 – 1384
ν C=N	1583	1537	1535
ν C=O	1750	1689	1674
ν N–H	3477	3472	3472

* δ = desdobramento; ν = estiramento

FIGURA 4.2: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante CSC e de seus respectivos complexos.

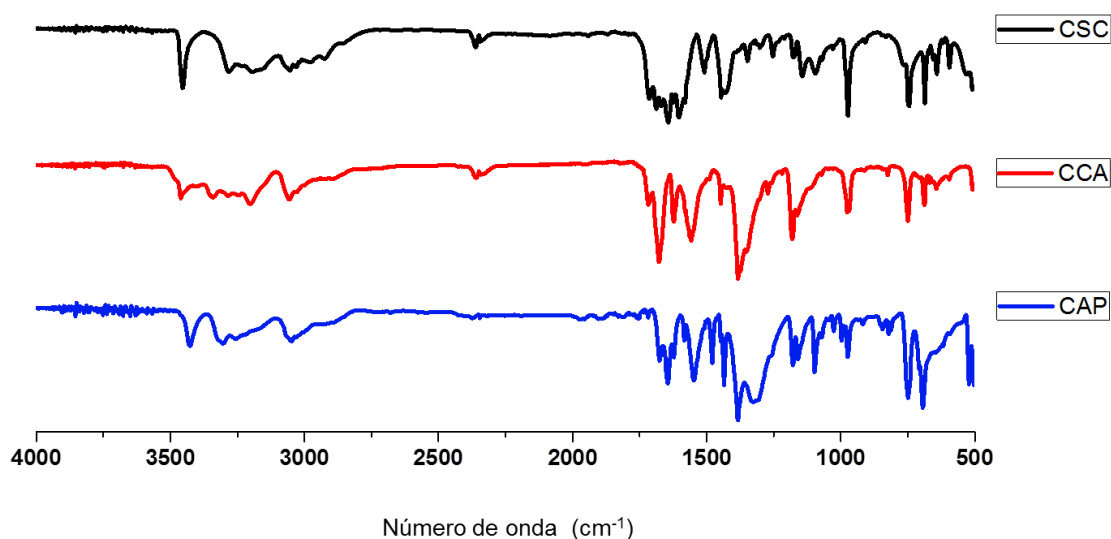


TABELA 4.5: Dados de infravermelho das bandas diagnóstico para o ligante CSC e seus respectivos complexos (Vide FIGURA 4.2).

Atribuição	CSC (cm ⁻¹)	CCA (cm ⁻¹)	CAP (cm ⁻¹)
δ C–H aromático	746	748	746
δ C=C	956	958	956
ν P–C	-	-	1097
ν NO ₃ ⁻	-	1350 – 1384	1350 – 1384
ν C=N	1603	1561	1546
ν C=O	1710	1667	1645
ν N–H	3454	3460	3431

* δ = desdobramento; ν = estiramento

Conforme destacado nos dados da TABELA 4.4 e TABELA 4.5, são observados deslocamentos significativos das bandas C=N e C=O dos complexos, quando comparados com o espectro dos ligantes livres. Tais deslocamentos indicam grande probabilidade de que os átomos de oxigênios e nitrogênio doadores se coordenaram ao centro metálico^{67,69}. Posto que houve um deslocamento médio de 60 cm^{-1} para a banda $\nu\text{ C=O}$ e 50 cm^{-1} para banda $\nu\text{ C=N}$ de uma região de maior número de onda para uma região menor número de onda. Com a formação da ligação com o centro metálico, espera-se que haja o enfraquecimento dessas ligações (C=O e C=N). O que é condizente com uma possível retrodoação da Ag(I) aos orbitais π^* desses grupos, levando a menores números de onda^{66,68,70,71}.

As bandas N-H se mantiveram presentes na formação dos complexos, isso indica que não houve a desprotonação do hidrogênio imínico dos ligantes. Junto a isso a presença da banda de NO_3^- nos espectros dos complexos, aponta que estes são compostos iônicos neutros. Dado que o ligante livre (BSC), o sal precursor AgNO_3 e a PPh_3 sejam neutros, espera-se que os complexos também sejam^{67,71-73}. Estas informações estruturais preliminares concordam com os dados previamente analisados de condutividade molar dos complexos, onde estes apresentaram-se como eletrólitos 1:1.

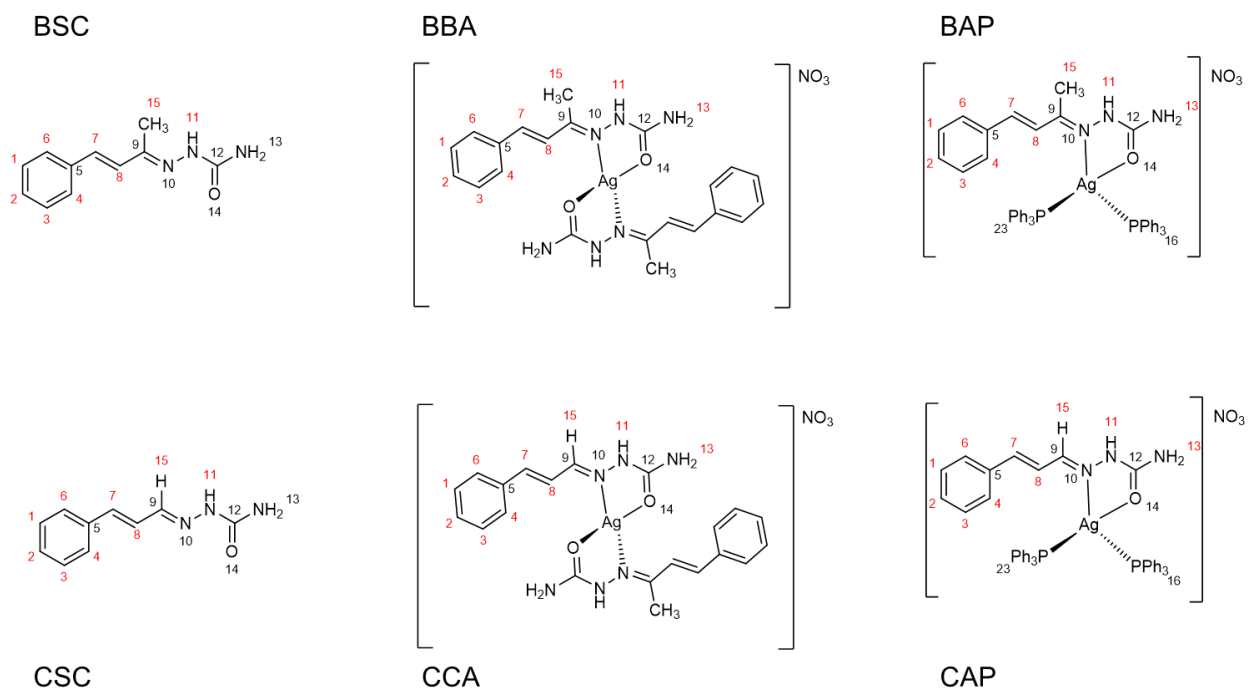
Para os complexos contendo ligante trifenilfosfina (BAP e CAP) foi observada uma banda característica na região de $1090 - 1100\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento da ligação P-C. Esta condição indica a possível presença do ligante trifenilfosfina na esfera de coordenação dos complexos formados, conforme o planejamento sintético proposto^{67,71-73}.

4.4 - Ressonância magnética nuclear

A análise de ressonância magnética nuclear teve como objetivo a caracterização em solução das estruturas propostas para os compostos sintetizados. A atribuição dos sinais de RMN foi feita segundo a numeração dos átomos apresentada nas estruturas da FIGURA 4.3. Foram realizados os experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P e HSQC ^1H e ^{13}C . Todos os espectros foram obtidos em DMSO-d_6 .

Para melhor compreender os resultados a serem discutidos, as estruturas foram numeradas de acordo com a FIGURA 4.3.

FIGURA 4.3: Referência numérica dos átomos das moléculas sintetizadas.

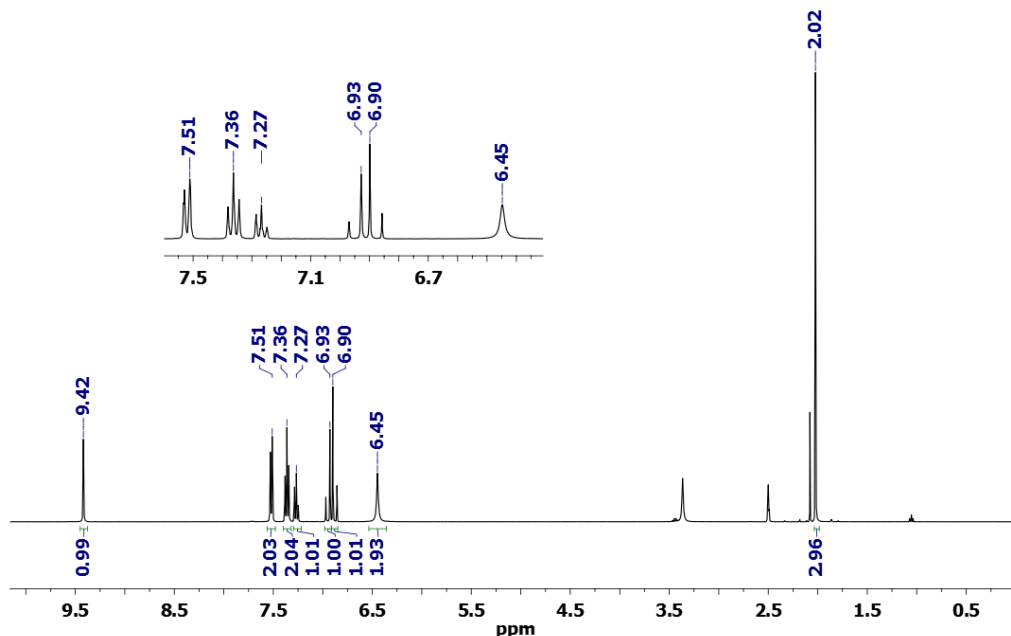


Os ligantes semicarbazona sintetizados já são conhecidos da literatura^{49,74}, desta forma os espectros de RMN foram obtidos para fins de comparação com os espectros dos complexos.

4.4.1 - Dados de RMN para o ligante BSC e seus complexos

4.4.1.1 - Ligante BSC

Na FIGURA 4.4 abaixo é apresentado o espectro de RMN 1H obtido para o ligante BSC. Em 2,50 ppm observa-se o sinal do solvente DMSO d₆, bem como o sinal em 3,4 ppm referente a água presente no solvente deuterado. O sinal em 2,07 ppm se referente a acetona de lavagem no tubo.

FIGURA 4.4: Espectro de RMN ^1H para o ligante BSC. *solvente: DMSO-d_6 

Conforme as estruturas dos ligantes representados na FIGURA 4.3 BSC, estas moléculas apresentam um sistema aromático monosubstituído um sistema vinílico, além dos grupos N-H referentes ao fragmento semicarbazona. Assim os dubletos em 6,95 e 6,88 ppm se referem ao acoplamento vicinal dos hidrogênios H7 e H8 da porção vinílica, cuja a constante de acoplamento é de 16 Hz, característico para esse sistema⁶⁷.

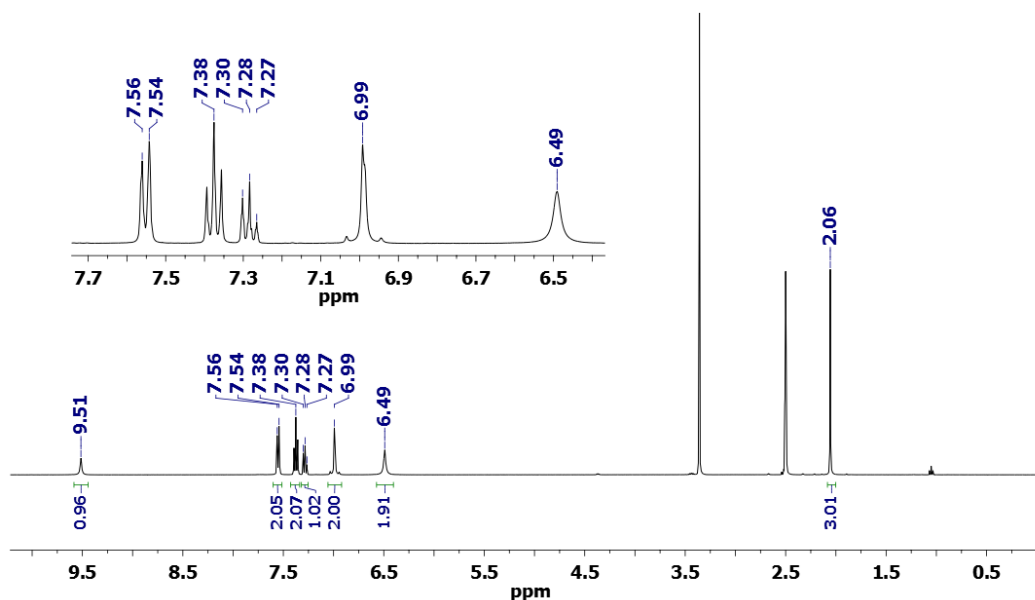
No anel aromático são observados três conjuntos de sinais, dois tripletos em 7,36 e 7,27 ppm e um dubleto em 7,52 ppm. O tripleto em 7,27 ppm se refere ao acoplamento do hidrogênio H2 em posição *para* com os hidrogênios em posição *meta* (hidrogênios H1 e H3), cujo sinal apresenta-se como um tripleto em 7,36 ppm. Por fim o dubleto em 7,52 ppm se refere aos hidrogênios em posição *orto* (hidrogênios H4 e H6). Este sistema apresenta constante de acoplamento de 8 Hz o que condiz com o valor esperado para um sistema aromático⁶⁷.

O hidrogênio H11 do grupo imida apresenta-se como um singlete em 9,42 ppm em uma região mais desblindada do espectro, pois este representa o hidrogênio mais ácido da molécula. Os hidrogênios H13 do grupo amida terminal apresentam-se como um singlete em 6,45 ppm. Os hidrogênios metílicos H15 apresentam-se como um singlete em 2,02 ppm.

4.4.1.2 - Complexo BBA

Em sequência, o espectro de RMN ^1H obtido para o complexo BBA é apresentado na FIGURA 4.5 abaixo. Por se tratar de um complexo bisquelato simétrico são observados apenas um conjunto de sinais relativo aos ligantes coordenados.

FIGURA 4.5: Espectro de RMN ^1H para o complexo BBA. *solvente: DMSO- d_6



Comparados aos sinais observados no espectro do ligante livre os sinais no espectro do complexo BBA apresentaram pouca diferença no deslocamento químico. O sinal dos hidrogênios vinílicos (hidrogênios H7 e H8) que deveriam aparecer como dois dubletos apresentam-se como dubletos sobrepostos originando um sinal em 6,99 ppm.

Os sinais do sistema aromático sofreram pouca influência em comparação aos sinais observados no espectro do ligante livre, isto pode estar relacionado ao distanciamento deste grupo do núcleo de coordenação (vide FIGURA 4.3 BBA). Os hidrogênios em posição *orto* (hidrogênios H4 e H6) apresentaram-se como um tripleto na região de 7,38 ppm, os hidrogênios *meta* (hidrogênios H1 e H3) como um tripleto em 7,28 ppm e o hidrogênio em posição *para* (hidrogênio H1) como um dubleto em 7,55 ppm.

No singleto em 9,51 ppm referente ao hidrogênio imínico (hidrogênio H11) houve um deslocamento de 0,11 ppm com relação ao ligante livre (9,42

ppm). Acredita-se que este hidrogênio sofre influência da coordenação ao centro metálico, se tornando mais desblindado em função da deslocalização eletrônica promovida pela coordenação bidentada proposta (vide FIGURA 4.3 BBA).

O sinal referente aos hidrogênios grupo amida terminal (hidrogênios H13) apresenta-se em 6,49 ppm. Os hidrogênios do grupo metila (hidrogênios H15) apresentam-se como um singleto em 2,06 ppm.

Para completar a caracterização em solução do complexo BBA foram realizados os experimentos do RMN ^{13}C e bidimensional HSQC ^1H ^{13}C . Estes espectros são apresentados nas FIGURA 4.6 e FIGURA 4.7.

FIGURA 4.6: Espectro de RMN ^{13}C para o complexo BBA. *solvente: DMSO- d_6

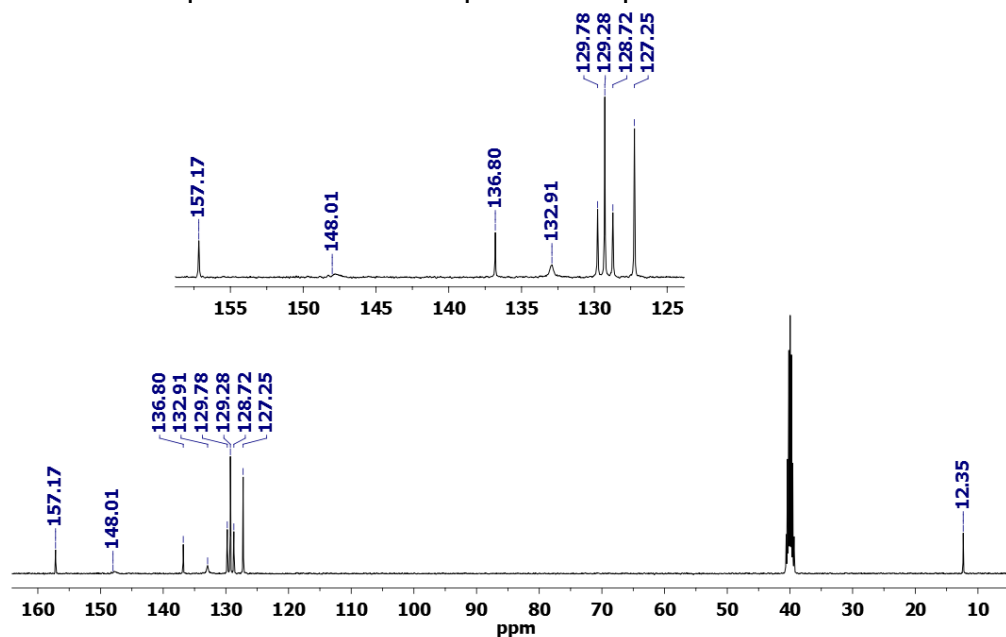
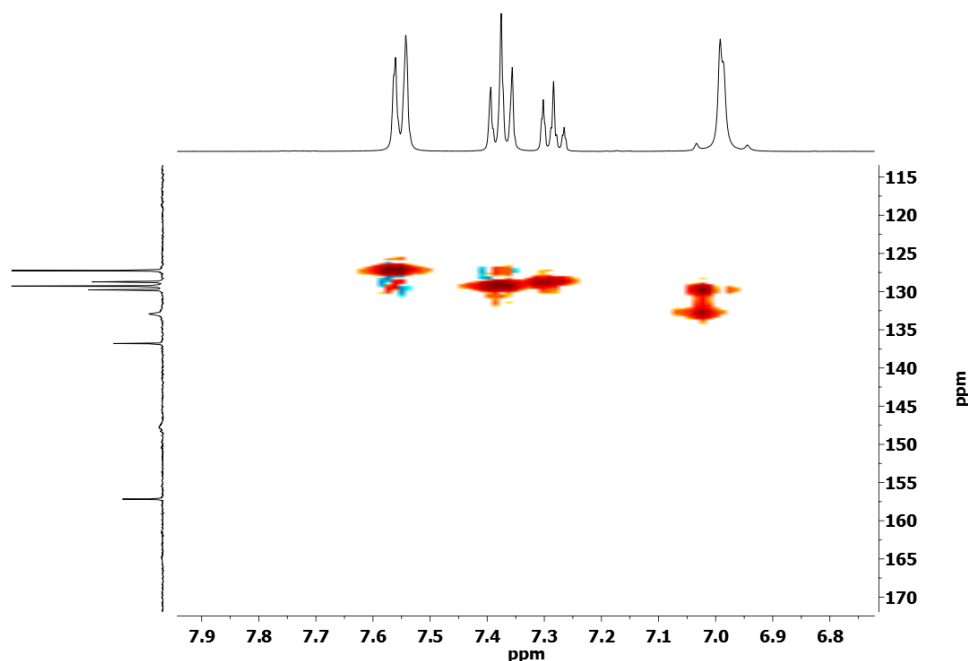


FIGURA 4.7: Espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C ampliado para o complexo BBA. *solvente: DMSO- d_6



Segundo a estrutura proposta para o complexo, esperava-se um total de 11 diferentes carbonos na molécula. Pelo espectro de RMN ^{13}C junto ao espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C foi possível identificar os carbonos do complexo. Conforme a FIGURA 4.3 (BBA), os carbonos em posição *meta* do sistema aromático (carbonos C1 e C3) se referem ao sinal em 129,37 ppm. O sinal referente aos carbonos em posição *orto* (carbonos 4 e 6) se encontra na região de 127,32 ppm, e o carbono em posição *para* do sistema (carbono C2) apresentou um sinal em 128,69 ppm⁶⁷.

Os carbonos vinílicos da estrutura (carbonos C7 e C8) apresentaram sinais em 129,87 e 132,87 ppm, respectivamente. Acredita-se que o sinal em 129,87 ppm seja do carbono C7 pois este está mais próximo a densidade do anel aromático, uma região mais blindada em comparação a região do carbono C8 em 132,87 ppm, mais próximo da região de coordenação. A metila (carbono C15) se encontra na região de 12,35 ppm⁶⁷.

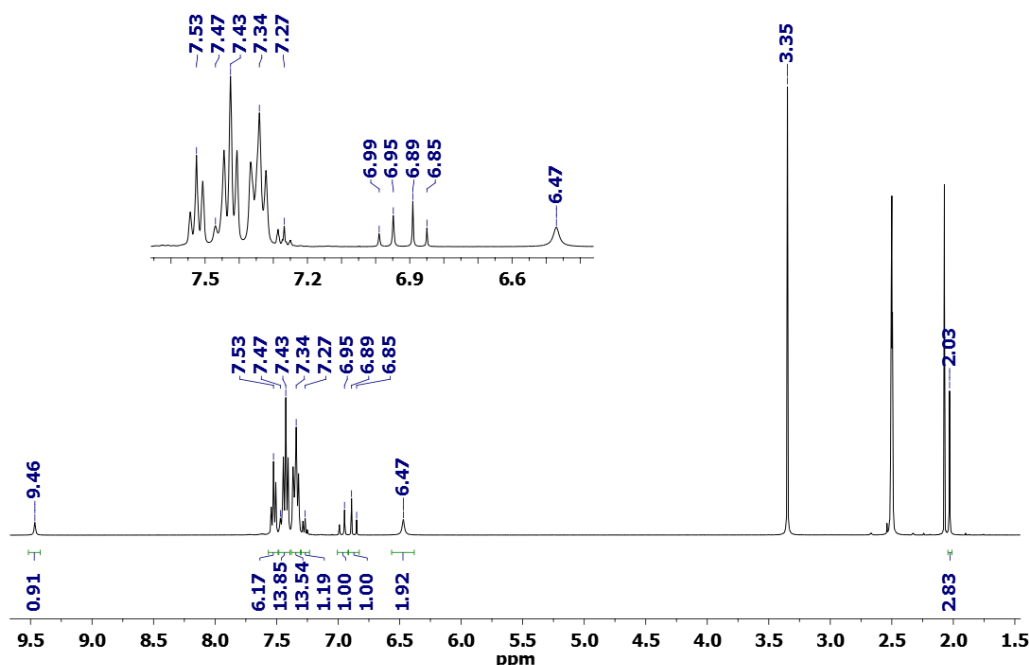
Para os carbonos quaternários (carbonos C5, C9 e C12) não há sinais que se correlacionem a nenhum hidrogênio no espectro bidimensional. Segundo a literatura^{39,67}, espera-se que o sinal em 137,16 ppm se refira ao carbono do sistema aromático (carbono C5) e o sinal em 148,00 ppm ao carbono (carbono C9) ligado ao nitrogênio (nitrogênio N10) e a metila (carbono

15). Por fim o sinal em 157,12 ppm, por se apresentar na região mais desblindada do espectro, representa o carbono carbonílico (carbono C12) da estrutura.

4.4.1.3 - Complexo BAP

O espectro de RMN ^1H para o complexo BAP é apresentado abaixo na FIGURA 4.8. Como esse complexo possui fosfinas como ligantes, os sinais de hidrogênio para os sistemas aromáticos apresentam alta multiplicidade e encobrimento de alguns sinais do sistema aromático da porção semicarbazona. Todavia as integrais calculadas mostram que, apesar da alta multiplicidade, é possível verificar que o número de hidrogênios está de acordo com o previsto para a estrutura da molécula.

FIGURA 4.8: Espectro de RMN ^1H para o complexo BAP. *solvente: DMSO- d_6



Devido a analogia do sistema a discussão para a porção semicarbazida foi suprimida por ser análoga ao do composto anterior com pequenos deslocamentos químicos, os quais podem ser conferidos na TABELA 4.6.

Conforme a estrutura proposta para o complexo representada na FIGURA 4.3 (BAP), comparando aos sinais observados no espectro do ligante

livre e o complexo bisquelato, os sinais no espectro do complexo BAP sofreram pouco deslocamento químico.

Na região dos hidrogênios aromáticos, que variou de 7,54 a 7,25 ppm, se observa uma alta multiplicidade. Esses sinais são referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos tanto do ligante trifenilfosfina quanto do anel do ligante semicarbazona. Como estes anéis possuem o sistema aromático monosubstituído e ambiente químico bastante semelhante, já se espera que haja uma sobreposição dos sinais. Tais sinais seriam dois dubletos e 4 tripletos, sendo que um desses dubletos estaria atribuído aos hidrogênios de posição *orto* dos anéis da trifenilfosfina e o outro dubleto atribuído aos hidrogênios em posição *orto* para a porção aromática da semicarbazona. Para os tripletos, estes estariam separados nas posições *meta* e *para*, sendo dois desses tripletos associados a trifenilfosfina e os outros dois tripletos ao ligante semicarbazona.

O hidrogênio H11 do grupo imida apresenta-se como um singlete em 9,46 ppm em uma região mais desblindada do espectro. É relevante frisar que apesar desse sinal não sofrer deslocamento significativo, apenas 0,04 ppm, ele assegura a não desprotonação desse hidrogênio na estrutura do complexo, o que é condizente com os dados de condutividade molar e de infravermelho (vide TABELA 4.4 e FIGURA 4.1). Os hidrogênios do grupo amida terminal (hidrogênio H13) apresentam-se como um singlete em 6,45 ppm e os hidrogênios metílicos (hidrogênios H15) apresentam-se como um singlete em 2,02 ppm.

Para o complexo BAP foram realizados os experimentos de RMN ^{13}C e bidimensional HSQC ^1H ^{13}C . Estes espectros são apresentados nas FIGURA 4.9 e FIGURA 4.10, respectivamente.

FIGURA 4.9: Espectro de RMN ^{13}C para o complexo BAP. *solvente: DMSO- d_6

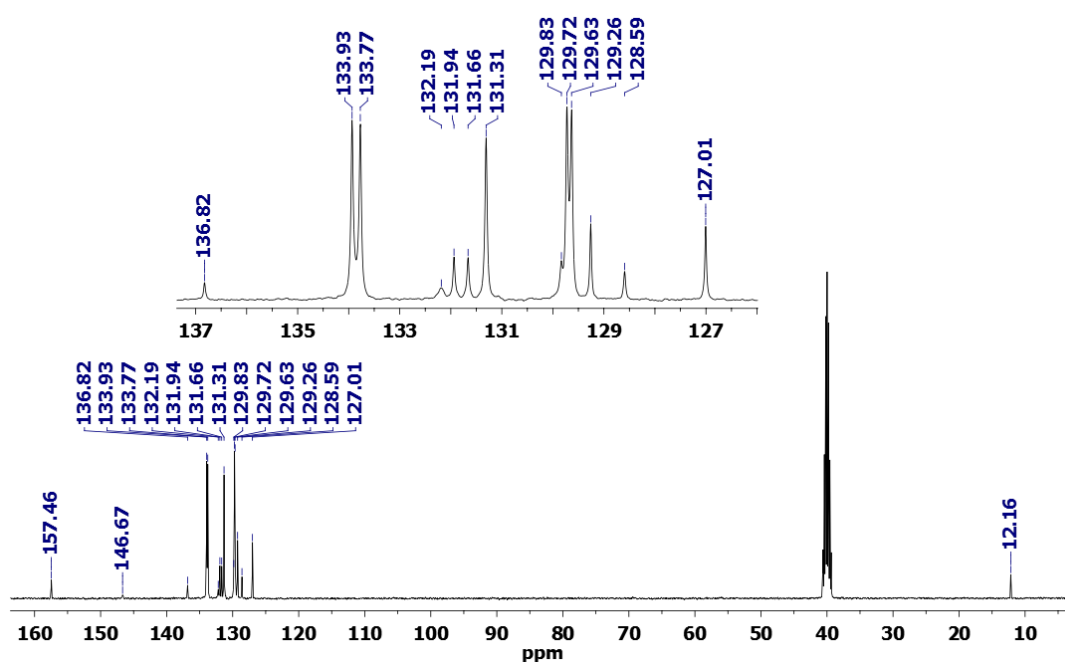
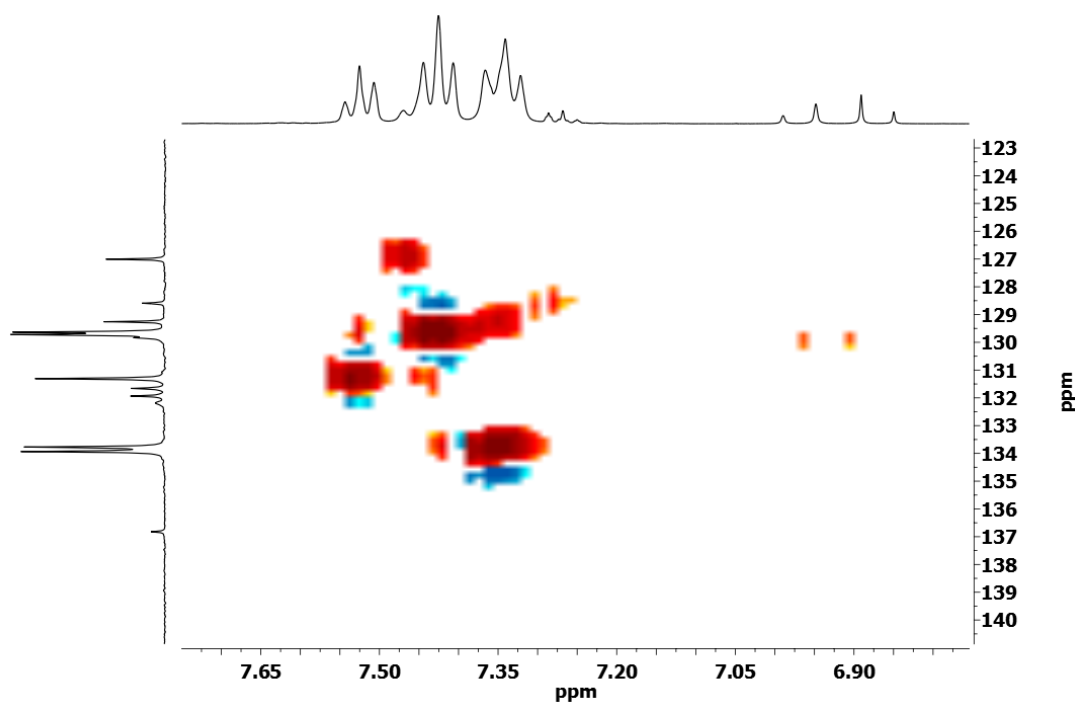


FIGURA 4.10: Espectro ampliado de RMN bidimensional HSQC ^1H ^{13}C para o complexo BAP. *solvente: DMSO- d_6

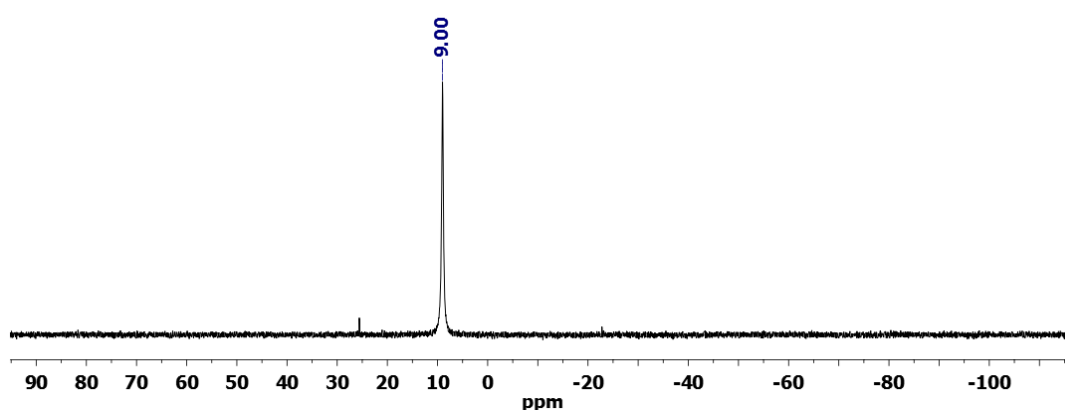


Utilizando os espectros de RMN ^{13}C junto ao espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C foi possível identificar os carbonos presentes na estrutura do complexo. Pode-se observar que os carbonos e hidrogênios aromáticos estão

presentes na molécula, porém tornou-se difícil a caracterização exata destes, como observado para os complexos bisquelatos, tais dados estão dispostos na TABELA 4.6.

O experimento de RMN ^{31}P teve como objetivo analisar a coordenação dos ligantes fosfínicos ao centro metálico. O espectro de RMN ^{31}P foi obtido logo após ao experimento de RMN ^1H , utilizando desta forma a mesma solução deuterada. O referente dado espectroscópico para o complexo BAP está disposto na FIGURA 4.11 abaixo.

FIGURA 4.11: Espectro de RMN ^{31}P para o complexo BAP. *solvente: DMSO- d_6



Trabalhos reportados na literatura^{75,76} mostram que o sinal de trifetilfosfina livre está na região de -8,00 ppm e o óxido de trifetilfosfina está na região de 25,00 ppm. O espectro de RMN ^{31}P para o complexo BAP (FIGURA 4.3 BAP) apresenta apenas um único singlete em 9,00 ppm para os ligantes trifetilfosfina coordenados. Isso demonstra que as duas trifetilfosfinas estão em um mesmo ambiente químico, uma vez que a soma das integrais no espectro de RMN ^1H equivale a um composto contendo duas moléculas de trifetilfosfina. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para os complexos BBA e BAP são apresentados na TABELA 4.6.

TABELA 4.6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para os complexos BBA e BAP.

Posição	δ ppm			
	BBA		BAP	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	7,38; <i>t</i> [2H] $J_{2,6} = 8$ Hz	129,39	7,54 – 7,29; <i>m</i> [2H]	129,27
2	7,28; <i>t</i> [1H] $J_{1,3} = 8$ Hz	128,69	7,27; <i>t</i> [1H] $J_{1,3} = 8$ Hz	128,59
3	7,38; <i>t</i> [2H] $J_{2,4} = 8$ Hz	129,37	7,54 – 7,29; <i>m</i> [2H]	129,27
4	7,55; <i>d</i> [2H] $J_{3,6} = 8$ Hz	127,32	7,47; <i>s</i> [2H]	127,00
5	-	137,16	-	136,82
6	7,55; <i>d</i> [2H] $J_{1,4} = 8$ Hz	127,32	7,47; <i>s</i> [2H]	127,00
7	6,99; <i>s</i> [2H]	129,87	6,97; <i>d</i> [1H] $J_8 = 16$ Hz	129,63
8	6,99; <i>s</i> [2H]	132,87	6,87; <i>d</i> [1H] $J_7 = 16$ Hz	129,72
9	-	148,00	-	146,67
10	-	-	-	-
11	9,51; <i>s</i> [1H]	-	9,46; <i>s</i> [1H]	-
12	-	157,12	-	157,46
13	6,49; <i>s</i> [2H]	-	6,47; <i>s</i> [2H]	-
14	-	-	-	-
15	2,06; <i>s</i> [3H]	12,35	2,03; <i>s</i> [3H]	-
PPh₃ (16 – 23)			7,34 – 7,53; <i>m</i> [30H]	129,00 - 133,95

* *s* = singleto; *d* = dubleto; *t* = tripleto; *m* = multipleto; *J* = constante de acoplamento.

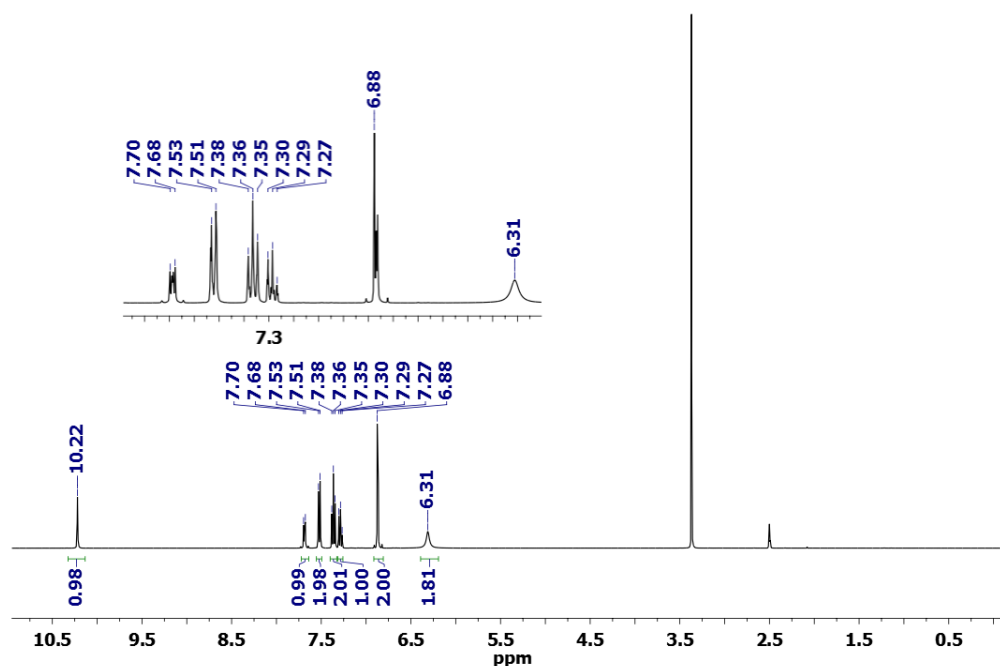
4.4.2 - Dados de RMN para o ligante CSC e seus complexos

4.4.2.1 - Ligante CSC

Na FIGURA 4.12 abaixo é apresentado o espectro de RMN ^1H obtido para o ligante CSC. Em 2,50 ppm observa-se o sinal do solvente DMSO- d_6 , bem como o sinal em 3,4 ppm referente a água presente no solvente deuterado.

O sinal em 2,07 ppm se refere a acetona de lavagem do tubo ou resíduo de acetonitrila da própria reação de obtenção dos compostos.

FIGURA 4.12: Espectro de RMN ^1H para o ligante CSC. *solvente: DMSO- d_6



A estrutura do ligante CSC (FIGURA 4.3 CSC) se semelhante ao ligante BSC (FIGURA 4.3 estrutura (A)) uma vez que observa-se apenas a substituição do grupo metila em seu arcabouço molecular por um hidrogênio. São notadas poucas diferenças na caracterização por RMN, dos compostos derivados do ligante CSC, em comparação aos compostos derivados do ligante BSC.

Sendo assim, conforme a FIGURA 4.3 CSC), o sinal em 6,88 ppm se refere ao acoplamento vicinal dos hidrogênios H7 e H8 da porção vinílica. Não foi possível calcular sua constante de acoplamento devido a multiplicidade do sinal. Esperava-se que tais sinais se comportassem de forma similar aos sinais do ligante BSC com os hidrogênios H7 e H8 apresentando uma constante de acoplamento de 16 Hz. Porém este comportamento não foi observado para o ligante CSC, visto que essa mudança pode estar relacionada a presença do hidrogênio H15 com sinal em 7,69 ppm.

No sistema aromático se observam 3 conjuntos de sinais, onde o tripleto com sinal em 7,29 ppm se refere ao hidrogênio em posição *para* (hidrogênio H2), o tripleto com sinal em 7,36 ppm aos hidrogênios em posição *meta*

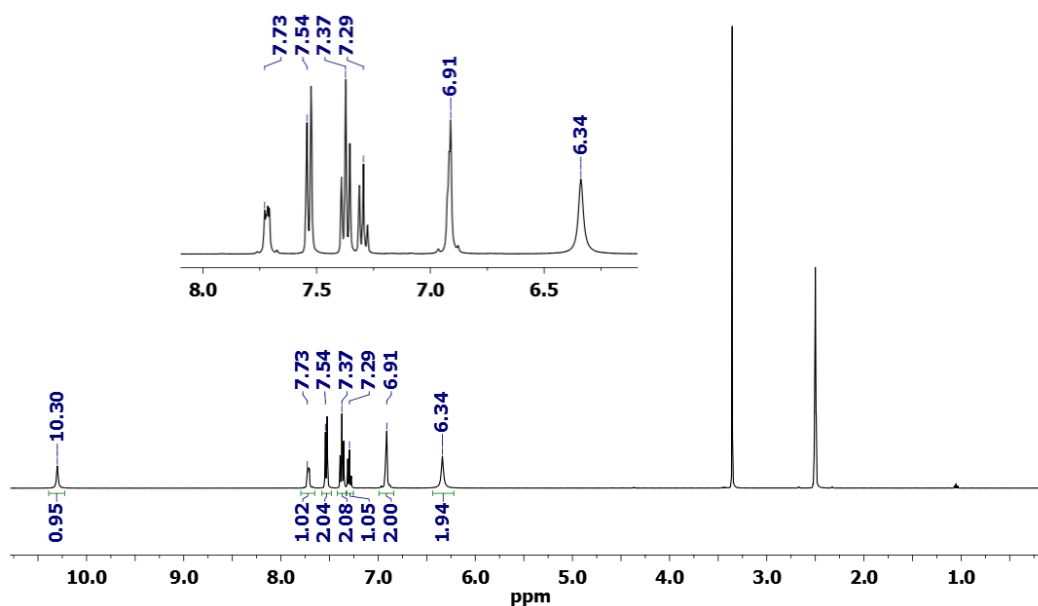
(hidrogênios H1 e H3) e por fim o dubleto com sinal em 7,52 ppm aos hidrogênios de posição *orto* (hidrogênios H4 e H6).

Para os hidrogênios ligados aos nitrogênios da molécula se observa um singlete em 6,31 ppm referentes aos hidrogênios do grupo amida terminal (hidrogênios H13). E para o hidrogênio mais ácido da molécula, (hidrogênio imínico) (hidrogênio H11) observa-se um sinal em 10,22 ppm.

4.4.2.2 - Complexo CCA

Em sequência, o espectro de ^1H obtido para o complexo CCA é apresentado na FIGURA 4.13 abaixo. Por se tratar de um complexo bisquelato simétrico são observados apenas um conjunto de sinais relativo aos ligantes coordenados.

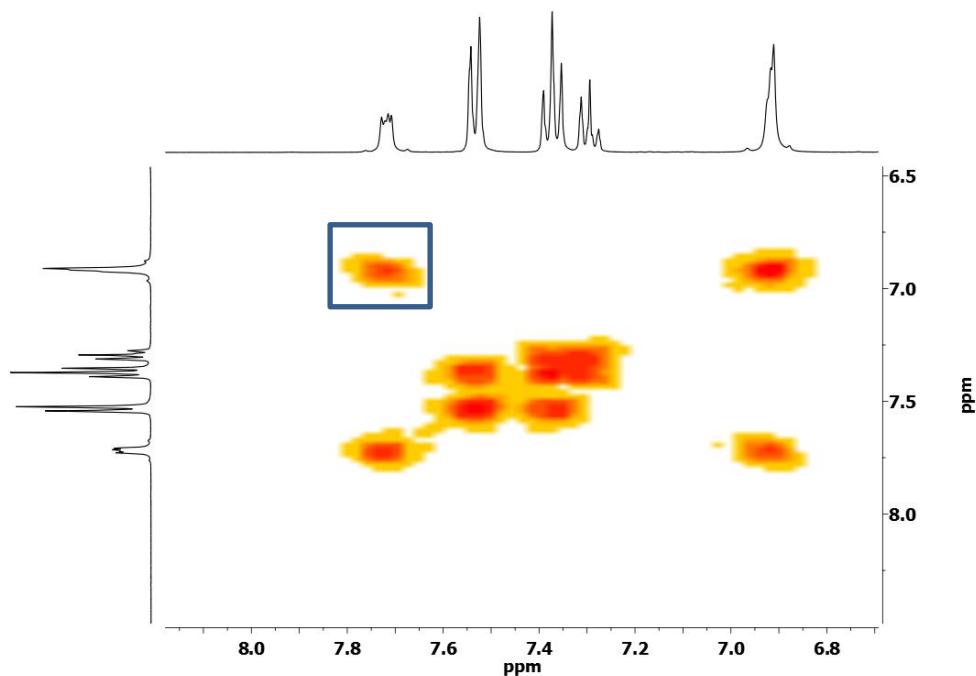
FIGURA 4.13: Espectro de RMN ^1H para o complexo CCA. *solvente: DMSO- d_6



Comparando os sinais analisados no espectro do ligante livre com os sinais observados no espectro do complexo CCA, verifica-se pouca diferença nos deslocamentos químicos. O sinal dos hidrogênios vinílicos (hidrogênios H7 e H8) aparecem como um singlete com sinais satélites em 6,91 ppm. Observa-se um multipletto em 7,73 ppm referente ao hidrogênio H15. Esta multiplicidade nos sinais dos hidrogênios H7, H8 e H15 é dada pelo acoplamento entre eles,

esse acoplamento pode ser observado no RMN bidimensional COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ destacado na FIGURA 4.14.

FIGURA 4.14: Espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) para o complexo CCA. *solvente: DMSO- d_6



Os sinais do sistema aromático não sofreram deslocamento em comparação aos sinais observados no espectro do ligante livre. Os hidrogênios em posição *orto* (hidrogênios H4 e H6), *meta* (hidrogênios H1 e H3) e *para* (hidrogênio H1) apresentam sinais em 7,37 7,29 e 7,54 ppm, respectivamente.

Para o singlete em 10,30 ppm, referente ao hidrogênio imínico (hidrogênio H11), houve um deslocamento de quase 0,10 ppm com relação ao ligante livre (10,22 ppm). Este mesmo deslocamento foi observado na comparação entre o ligante BSC e seu complexo bisquelato BBA (vide FIGURA 4.3 BSC e BBA).

Completando a caracterização em solução do complexo CCA foram realizados os experimentos de RMN ^{13}C e bidimensional HSQC $^1\text{H} ^{13}\text{C}$. Estes espectros são apresentados nas FIGURA 4.15 e FIGURA 4.16.

FIGURA 4.15: Espectro de RMN ^{13}C para o complexo CCA. *solvente: DMSO- d_6

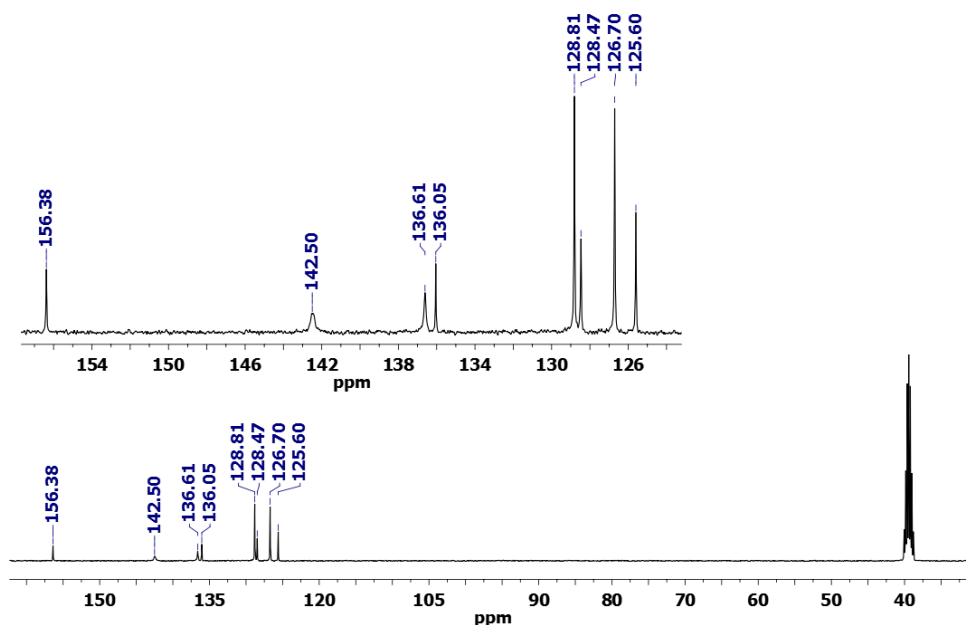
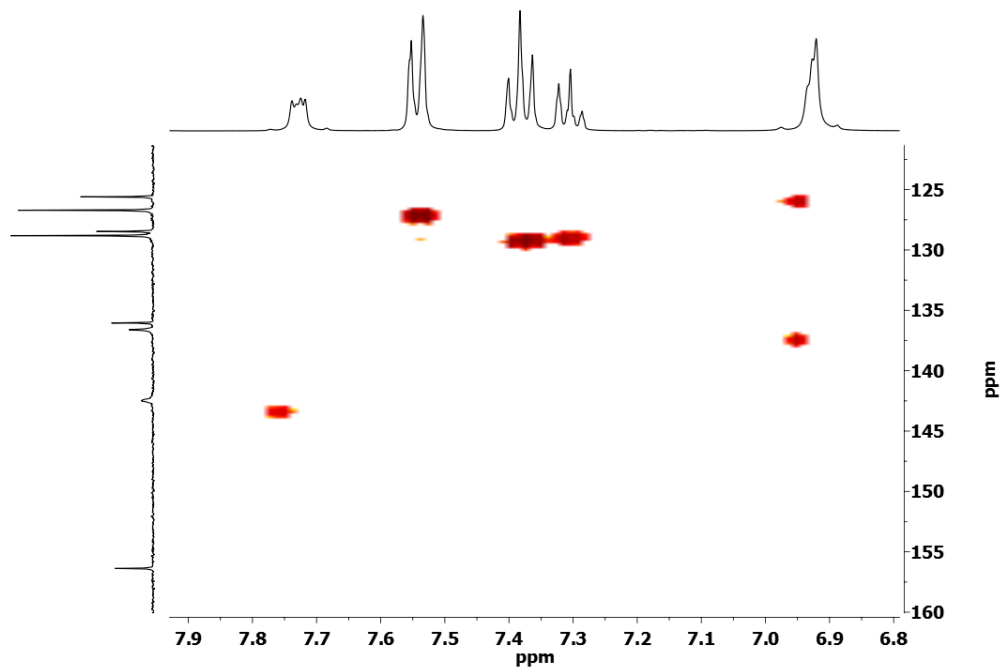


FIGURA 4.16: Espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C ampliado para o complexo CCA. *solvente: DMSO- d_6



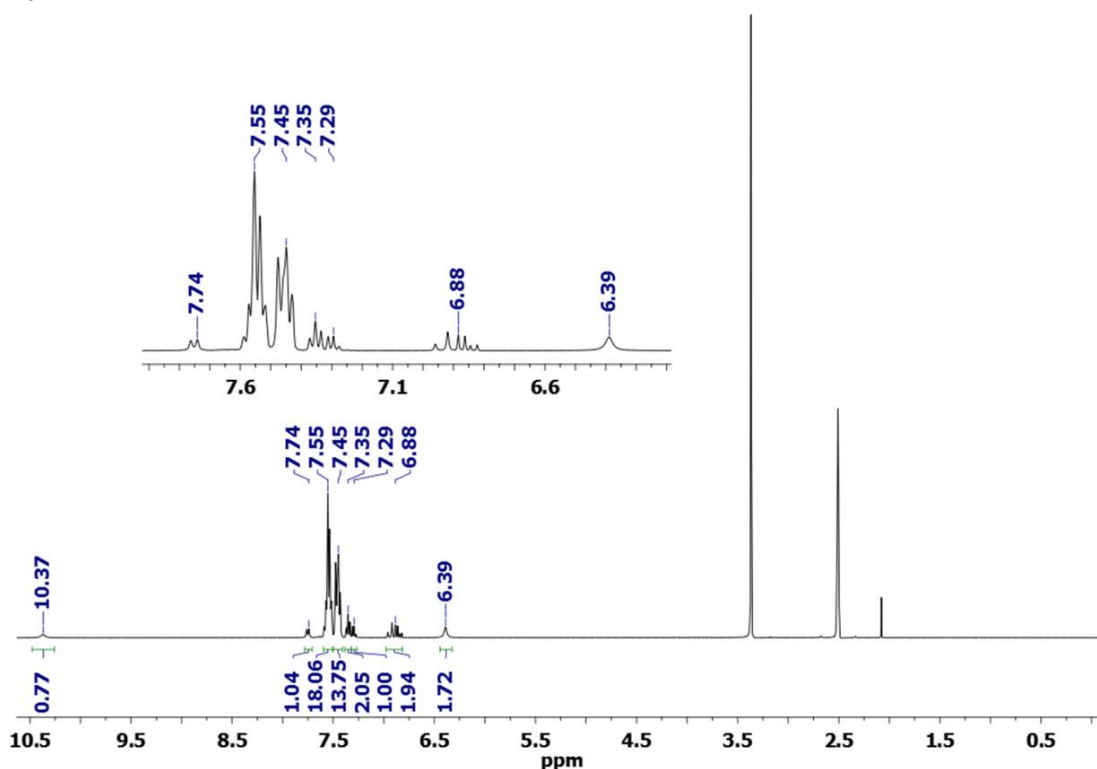
Através do espectro de RMN ^{13}C junto ao espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C foi possível identificar os carbonos presentes na estrutura do complexo. Conforme a FIGURA 4.3 (CSC) os carbonos em posição *meta* do sistema aromático (carbonos C1 e C3) se referem ao sinal em 128,81 ppm, o sinal referente aos carbonos em posição *orto* (carbonos C4 e C6) se encontra na região de 126,70 ppm, e o carbono em posição *para* do sistema (carbono C2)

possui sinal em 128,47 ppm⁶⁷. Os carbonos vinílicos da estrutura (carbonos C7 e C8) apresentaram um único sinal em 125,60 ppm. Para os carbonos quaternários (carbonos C5, C9 e C12) não há sinais que se correlacionem a nenhum hidrogênio no espectro bidimensional. Segundo dados da literatura^{39,67}, espera-se que o sinal em 136,61 ppm esteja relacionado ao carbono do sistema aromático (carbono C5), o sinal em 142,50 ppm ao carbono C9, e por fim o sinal em 157,12 ppm, por apresentar-se em uma região mais desblindada do espectro, espera-se que este se refira ao grupo carbonila (carbono C12) da estrutura.

4.4.2.3 - Complexo CAP

O espectro de RMN ¹H para o complexo CAP é mostrado abaixo na FIGURA 4.17. Como esse complexo, assim como o complexo BAP, possui ligantes trifenilfosfina, os sinais para os sistemas aromáticos tanto do ligante semicarbazona quanto das trifenilfosfinas, apresentam-se sobrepostos. Devido a isso há uma alta multiplicidade nesta região, porém as integrais calculadas concordam com o número de hidrogênios da estrutura proposta para o complexo. O espectro de RMN ¹H para o complexo CAP é apresentado na FIGURA 4.17 abaixo.

FIGURA 4.17: Espectro de RMN ^1H para o complexo CAP. *solvente: DMSO- d_6



Conforme a estrutura do complexo representada na FIGURA 4.3, CAP), comparando-se os sinais analisados no espectro do ligante livre aos sinais observados no espectro do complexo CAP, verifica-se pouca diferença nos valores de deslocamento químico dos hidrogênios, pelo fato dos compostos sintetizados serem análogos em relação a porção semicarbazona da molécula, os dados similares estão apresentados na TABELA 4.7.

Os experimentos de RMN ^{13}C e bidimensional de HSQC ^1H ^{13}C foram realizados para o complexo CAP. Os espectros obtidos são apresentados nas FIGURA 4.18 e FIGURA 4.19.

FIGURA 4.18: Espectro de RMN ^{13}C para o complexo CAP. *solvente: DMSO- d_6

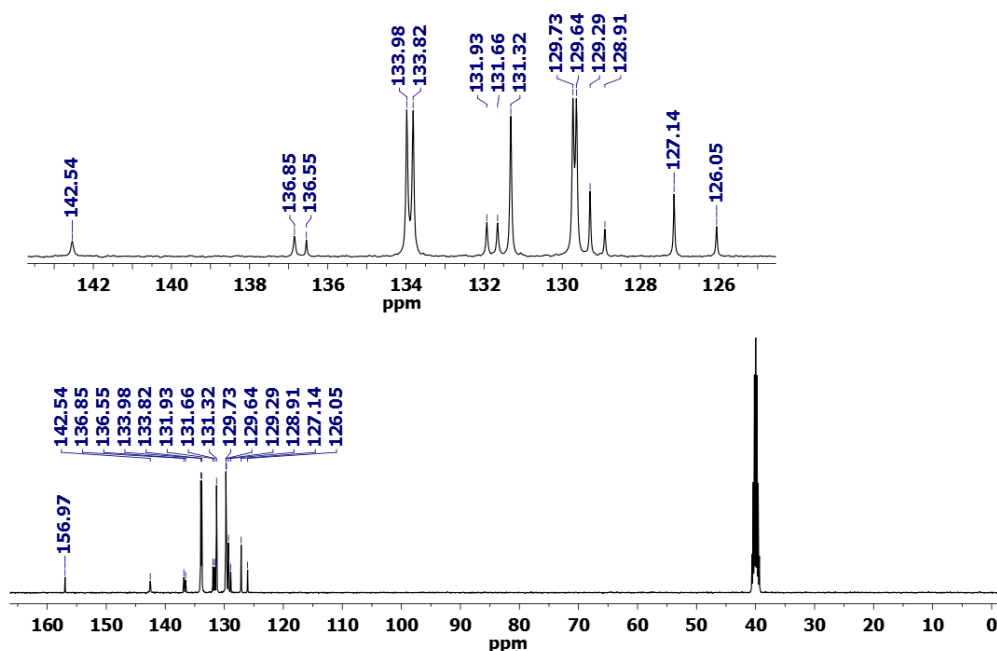
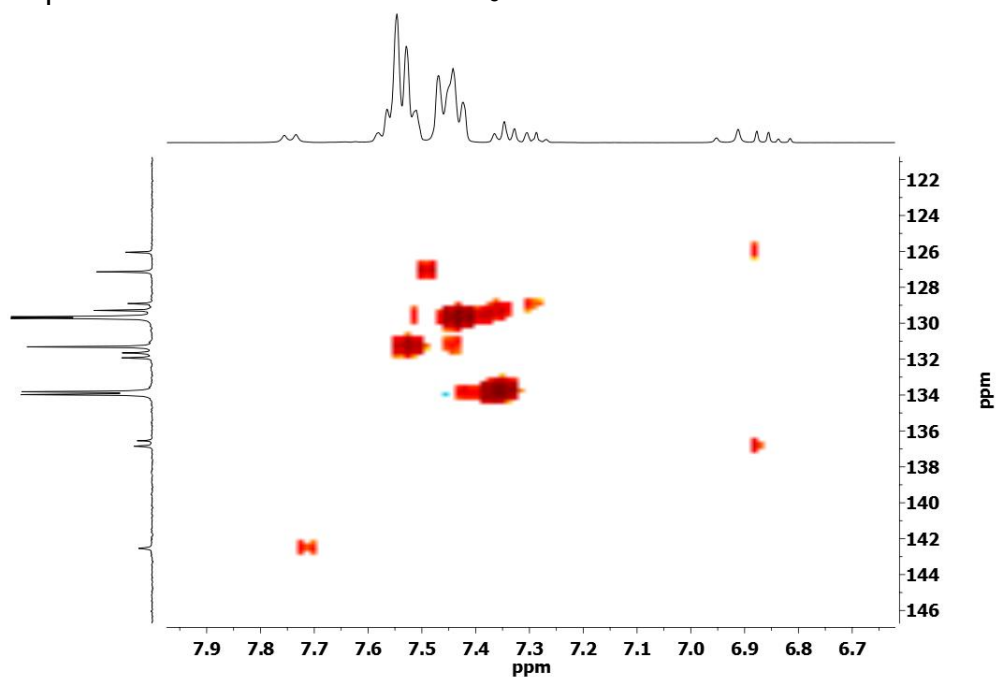


FIGURA 4.19: Espectro bidimensional HSQC ^1H ^{13}C ampliado para o complexo CAP. *solvente: DMSO- d_6



Analisando os espectros de RMN ^{13}C e bidimensional HSQC ^1H ^{13}C (FIGURA 4.18 e FIGURA 4.19) de forma conjunta foi possível identificar os carbonos presentes na estrutura do complexo CAP. Similarmente ao observado para o complexo BAP, os carbonos e hidrogênios aromáticos não puderam ser caracterizados individualmente como nos complexos bisquelatos.

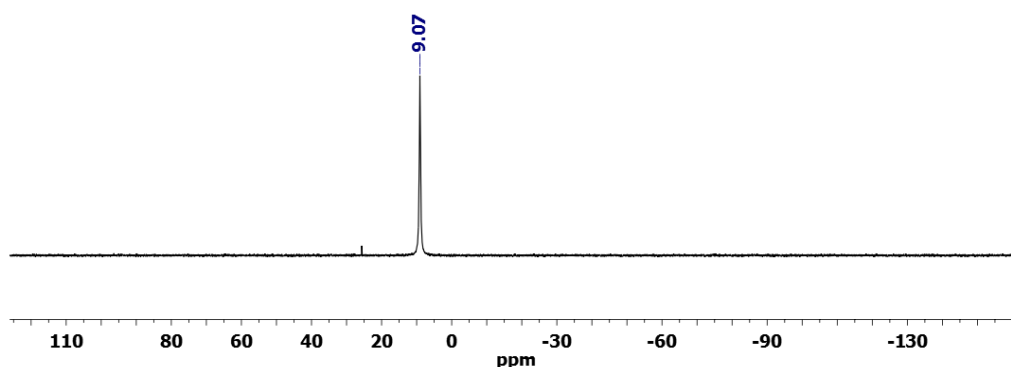
Conforme a FIGURA 4.3 (CAP)) o sinal em 128,91 ppm é atribuído ao carbono C2 do sistema aromático do ligante semicarbazona, pois este sinal é característico ao hidrogênio em posição *para* (hidrogênio H2) no espectro bidimensional. Os carbonos em posição *meta* do sistema aromático (carbonos C1 e C3) se referem ao sinal em 129,29 ppm.

Para os carbonos em posição *orto* (carbonos C4 e C6) são atribuídos os sinais em 131,66 e 131,96 ppm, respectivamente. Os sinais no espectro de RMN ^1H referentes aos hidrogênios ligados a esses carbonos (carbonos C4 e C6), estão sobrepostos aos sinais dos hidrogênios dos anéis aromáticos dos ligantes trifenilfosfina. Com essa sobreposição de sinais não é possível atribuir todos os hidrogênios do sistema aromático da molécula, bem como os carbonos. Todavia é possível verificar que existe uma diferença no espectro de RMN ^{13}C para os carbonos desse sistema.

Os sinais dos carbonos vinílicos (carbonos C7 e C8) apresentam-se em 126,05 e 136,55 ppm, respectivamente. O carbono aromático (carbono C5), é atribuído ao sinal em 136,85 ppm. A carbonila (carbono C12) é atribuída ao sinal em 156,97 ppm por ser o sinal que se apresenta em uma região mais desblindada do espectro. O carbono C9 é atribuído ao sinal em 142,54 ppm^{39,67}.

O RMN ^{31}P teve como objetivo verificar a coordenação dos ligantes trifenilfosfina ao centro metálico. O espectro de RMN ^{31}P foi obtido logo após ao espectro de RMN ^1H , utilizando-se desta forma a mesma solução deuterada. O espectro de RMN ^{31}P para o complexo CAP está disposto na FIGURA 4.20 abaixo.

FIGURA 4.20: Espectro de RMN ^{31}P para o complexo CAP. *solvente: DMSO- d_6



O espectro de RMN ^{31}P para o complexo CAP (FIGURA 4.3 CAP) mostra um único singlete em 9,07 ppm para os dois ligantes trifenilfosfina coordenados. Essa mesma região foi observada de forma similar no espectro de RMN ^{31}P do complexo BAP, o que reforça a condição de estarem em um mesmo ambiente químico. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para os complexos BBA e BAP são apresentados na TABELA 4.7.

TABELA 4.7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para os complexos CCA e CAP.

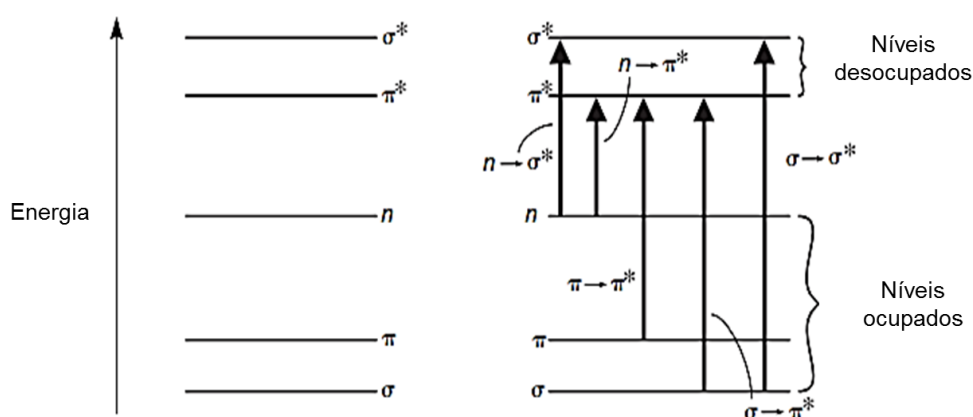
Posição	δ ppm			
	CCA		CAP	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	7,37; <i>t</i> [2H] $J_{2,6} = 8$ Hz	128,81	7,35; <i>t</i> [2H] $J_{2,6} = 8$	129,29
2	7,29; <i>t</i> [1H] $J_{1,3} = 8$ Hz	128,47	7,27; <i>t</i> [1H] $J_{1,3} = 8$	128,91
3	7,37; <i>t</i> [2H] $J_{2,4} = 8$ Hz	128,81	7,35; <i>t</i> [2H] $J_{2,6} = 8$	129,29
4	7,52; <i>d</i> [2H] $J_{3,6} = 8$ Hz	126,70	7,45; <i>s</i> [2H]	131,66
5	-	136,61	-	136,85
6	7,52; <i>d</i> [2H] $J_{1,4} = 8$ Hz	126,70	7,45; <i>s</i> [2H]	131,96
7	6,91; <i>m</i> [1H]	125,60	6,88; <i>m</i> [1H]	126,05
8	6,91; <i>m</i> [1H]	125,60	6,88; <i>m</i> [1H]	136,55
9		142,50		142,54
10	-	-	-	-
11	10,30; <i>s</i> [1H]	-	10,37; <i>s</i> [1H]	-
12	-	156,38	-	156,97
13	6,34; <i>s</i> [2H]	-	6,38; <i>s</i> [2H]	-
14	-	-	-	-
15	7,72; <i>m</i> [1H]		7,74; <i>d</i> [1H]	
PPh₃ (16 – 23)	-	-	7,34 – 7,53; <i>m</i> [30H]	129,62 – 134,00

4.5 - Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível é uma das técnicas mais utilizadas no estudo de compostos inorgânicos⁶⁵. Nessa técnica, são observadas transições eletrônicas que ocorrem nos orbitais moleculares^{65,66,77}. Essas transições são representadas na forma de bandas de absorção, que são centradas próximas aos comprimentos de ondas de maior transição⁶⁶.

A radiação eletromagnética na região do ultravioleta e do visível está entre próximo de 100 a 1000 nm. Absorções no espectro eletrônico, demonstra intensidades características e propriedades moleculares, como transições eletrônicas em orbitais moleculares. Átomos ou moléculas passam de um estado de menor energia para um estado de maior energia^{66,78}. A maioria das moléculas orgânicas os orbitais ocupados de menor energia são os orbitais σ . Os orbitais π (ligantes) ficam em níveis energéticos mais altos e orbitais n (não-ligantes) ficam em níveis ainda maiores. Orbitais antiligantes (σ^* e π^*) são os de maior energia frente aos demais⁶⁶. Na FIGURA 4.21 é ilustrado um esquema dos níveis de energia e transições.

FIGURA 4.21: Níveis de energia e transições eletrônicas.



Fonte: Pavia, L. D. *et. al.* 2012⁽⁶⁶⁾

Os princípios da espectroscopia de UV-vis seguem a Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar, b é o caminho óptico que o feixe percorre e c é a concentração molar das espécies^{65,66}.

Neste trabalho a espectroscopia no UV-vis foi utilizada para identificar se houve mudanças nos grupos cromóforos das moléculas estudadas após a coordenação. Os espectros eletrônicos do ligante e dos complexos foram obtidos em DMSO na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A FIGURA 4.22 apresenta os espectros sobrepostos para o ligante BSC e seus respectivos complexos, enquanto que a FIGURA 4.23 os espectros sobrepostos para o ligante CSC e seus respectivos complexos.

FIGURA 4.22: Espectro de absorção na região do ultravioleta visível para o ligante BSC e seus respectivos complexos.

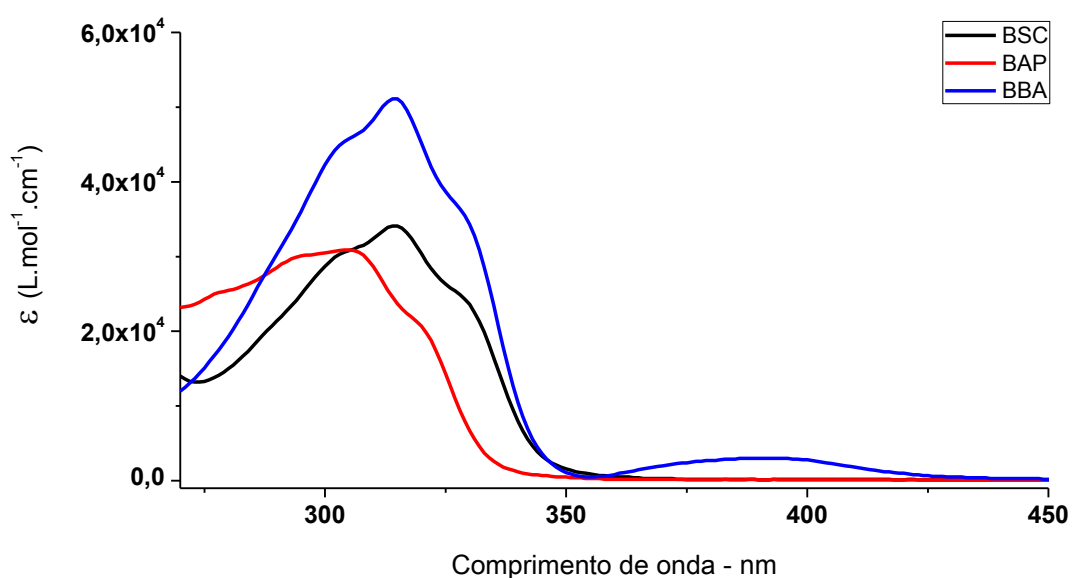
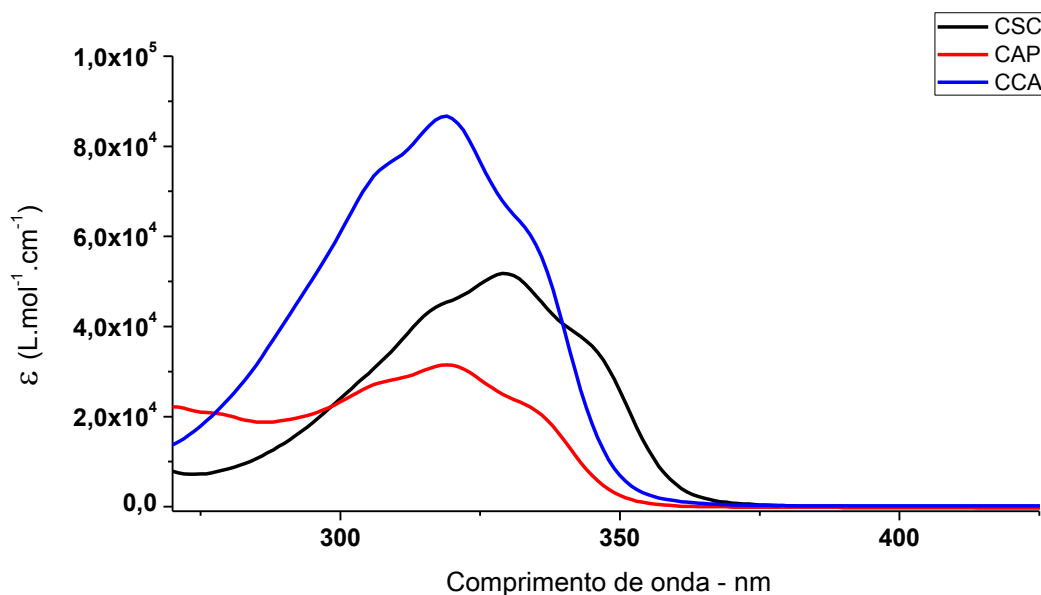


FIGURA 4.23: Espectro de absorção na região do ultravioleta visível para o ligante CSC e seus respectivos complexos.



Os espectros dos ligantes (BSC e CSC), destacados em preto nas figuras, mostraram valores de alta absorvidade molar, $34100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o ligante BSC e $51700 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o ligante CSC. Essa banda em 300 - 350 nm é atribuída a uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ^{65,66}.

Nos complexos nota-se visivelmente que os complexos bisquelatos (BBA e CCA) tiveram efeito hipercrômico na banda na região de 300 a 350 nm, ou seja, um aumento na intensidade dessa banda. Isso pode ser explicado, pelo aumento de grupos cromóforos, referentes aos anéis aromáticos, grupos C=N e C=O, presentes nesses complexos ^{78,79}.

Com exceção do complexo BBA, todos os complexos (CAP CCA e BAP) apresentaram deslocamento hipsocrômico em relação ao espectro dos ligantes livres. Esse deslocamento é um indício de que a coordenação dos ligantes ao centro metálico ocorreu. Não se espera que ocorram transições do ligante para o metal nesse caso, pois a prata(I) encontra-se com seus orbitais “d” preenchidos ($4d^{10}$), o que torna este tipo de transição proibida ^{65,66,78}.

O surgimento da banda em 390 nm com intensidade de $3000 \text{ (L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ para o complexo BBA é atribuída a banda de transferência de carga Metal-Ligante (M-L) ⁷⁸.

O espectro eletrônico para trifetilfosfina livre, apresenta bandas no UV abaixo de 290 nm ^{67,79,80}. Os complexos com trifetilfosfina (BAP e CAP) apresentam uma banda na região abaixo de 290 nm, banda esta que não está presente no espectro do ligante semicarbazona livre, o que pode indicar a coordenação destes ligantes a prata. Na TABELA 4.8 são mostrados os pontos de máximo para as bandas mostradas nos espectros.

TABELA 4.8: Principais bandas na região do UV-vis para os compostos sintetizados.

Compostos	λ (nm)	ϵ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
BSC	314	34100
BBA	314	51100
	390	3000
BAP	305	25900
	290	25900

CSC	330	51700
CCA	319	86700
CAP	319	31500

* λ = comprimento de onda em nm; ϵ = absorvidade molar em $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

4.6 - Estabilidade em solução

O experimento de condutividade molar e RMN ^{31}P foram utilizados para determinar a estabilidade dos complexos em solução. As informações quanto a estabilidade dos compostos em DMSO torna-se indispensável para os posteriores ensaios de viabilidade celular. Medidas de condutividade molar dos compostos em DMSO e análises de RMN ^{31}P em DMSO- d^6 foram feitas em 0, 24 e 48 horas. Na TABELA 4.9 são mostrados os valores das condutividades nos tempos analisados, e nas FIGURA 4.24 e FIGURA 4.25 as análises de RMN ^{31}P para os complexo BAP e CAP respectivamente.

TABELA 4.9: Estabilidade dos compostos em DMSO por condutividade molar.

Tempo / h	$\mu S \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$				Eletrólito
	CAP	BBA	BAP	CCA	
0	75,1	56,3	37,0	76,1	1:1
24	75,5	58,7	38,1	75,0	1:1
48	76,1	59,1	37,5	75,9	1:1

FIGURA 4.24: Estabilidade do complexo BAP em DMSO- d_6 por RMN ^{31}P .
*solvente: DMSO- d_6

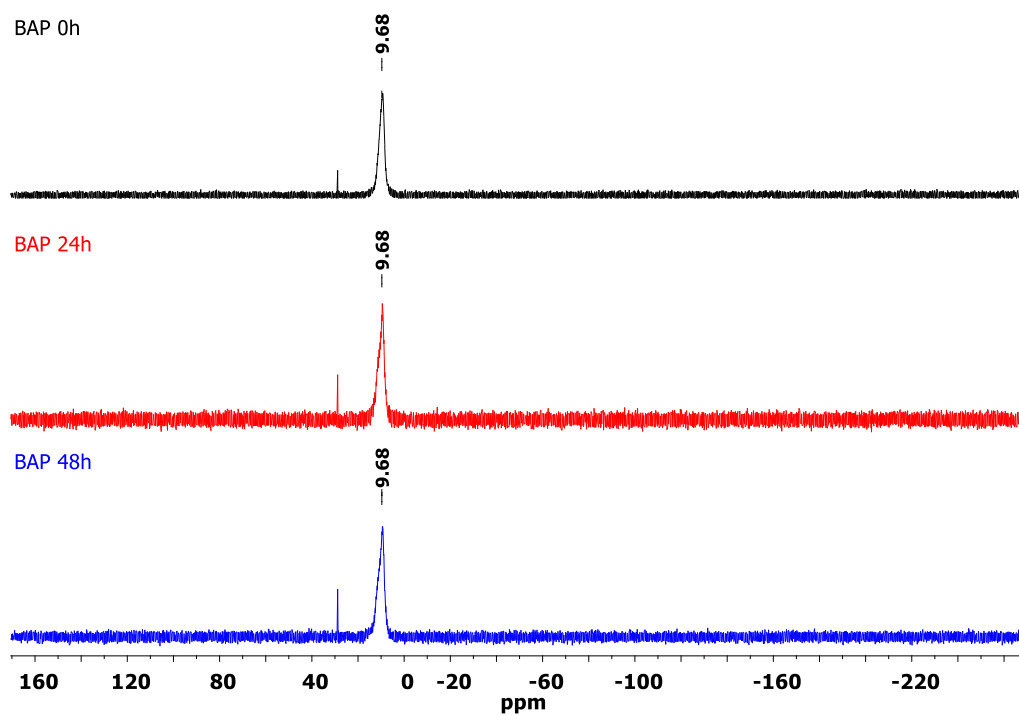
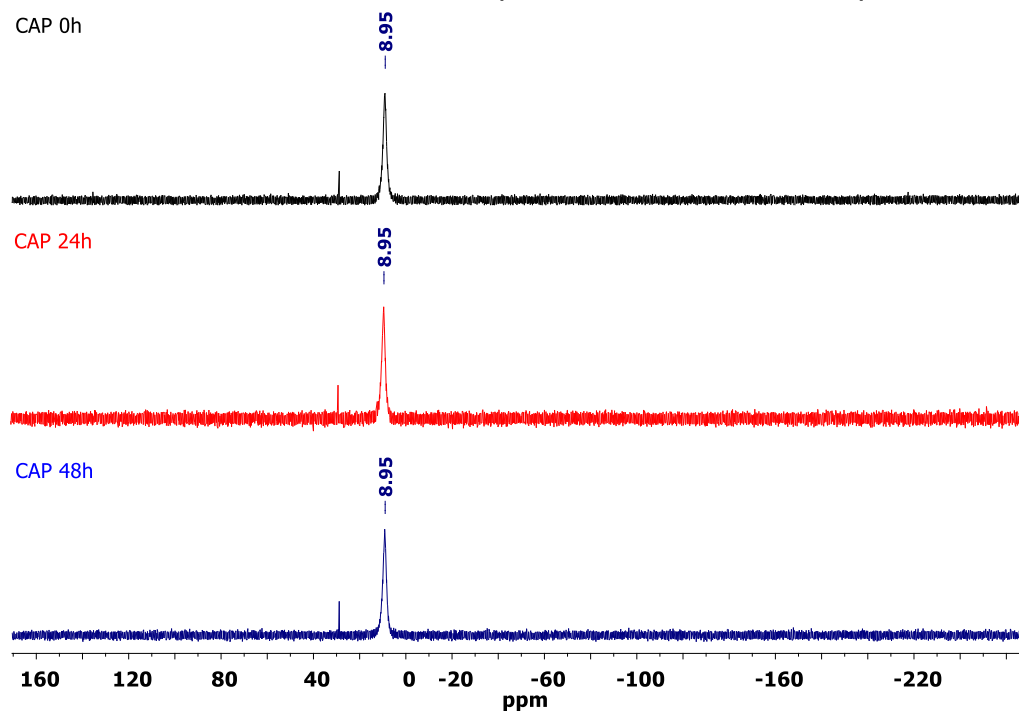


FIGURA 4.25: Estabilidade do complexo CAP em DMSO- d_6 por RMN ^{31}P .



Como visto na TABELA 4.9, não foram observadas mudanças nos valores de condutividade molar para os complexos nos tempos avaliados,

indicando que novas espécies não foram geradas. O mesmo pode ser observado para os espectros de RMN nos tempos analisados, onde não houve alteração nos sinais, indicando que as espécies permaneceram estáveis no período avaliado.

4.7 - Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade estão entre os primeiros ensaios *in vitro*, utilizados para se avaliar a toxicidade de substâncias em diversos tecidos. Eles são essenciais no entendimento das características farmacológicas e biológicas de agentes quimioterápicos^{81,82}. Com esses ensaios pode-se medir a viabilidade celular, integridade da membrana celular, proliferação celular e atividade metabólica da célula⁸³.

O método empregado no trabalho para a determinação do IC₅₀ (concentração de um composto que inibe 50% da viabilidade celular)^{81,83}, foi o de MTT. Esse ensaio é baseado na conversão do MTT (Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em cristais de formazana pelas células vivas, o que determina a atividade mitocondrial⁸⁴. Como a atividade mitocondrial é relacionada com o de células viáveis, esse ensaio é amplamente utilizado para medir os efeitos citotóxicos de possíveis fármacos em diferentes linhagens celulares⁸⁴.

Neste trabalho, foram utilizadas quatro linhagens celulares humanas: MDA-MB-231 (câncer de mama); MCF7 (câncer de mama); DU-145 (câncer de próstata); PNT2 (células de próstata não tumorais). Com isso os valores de IC₅₀ obtidos para os compostos sintetizados estão listados na TABELA 4.10 e * Ref.⁸⁵

FIGURA 4.26.

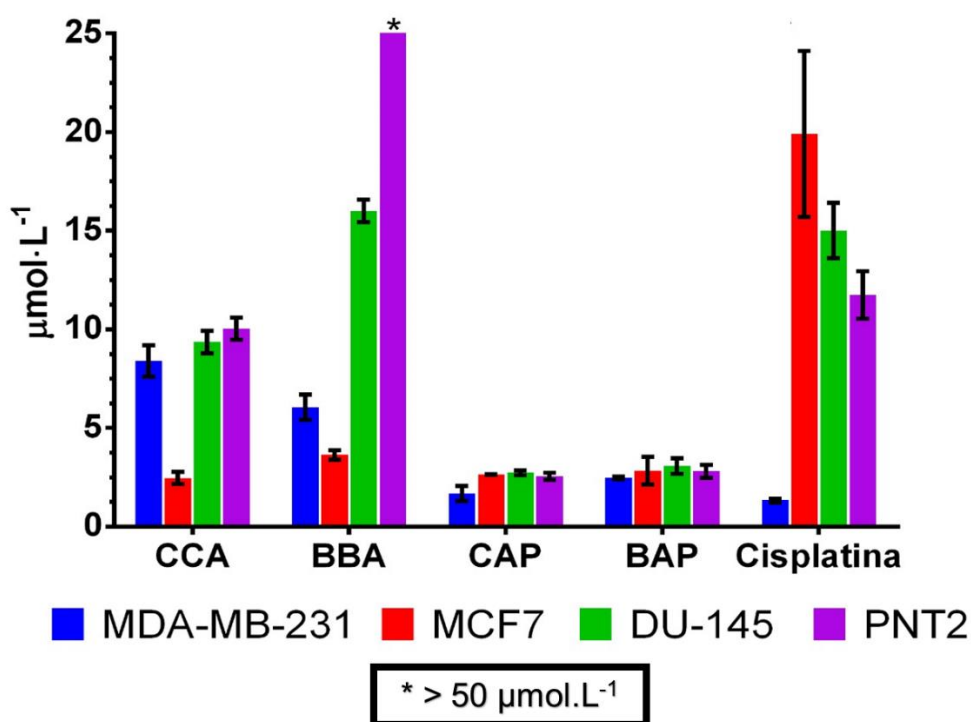
TABELA 4.10: Dados de IC₅₀ (μmol·L⁻¹) para os compostos sintetizados.

Compostos	Linhagens celulares
-----------	---------------------

	MDA-MB-231	MCF7	DU-145	PNT2
BSC	>50	>50	>50	>50
CSC	>50	>50	>50	>50
BBA	6,05±0,64	3,63±0,23	16,0±0,98	>50
BAP	2,48±0,07	2,84±0,69	3,07±,038	2,80±0,32
CCA	8,40±0,80	2,46±0,30	9,35±0,57	10,03±0,56
CAP	1,68±0,38	2,65±0,01	2,73±0,12	2,55±0,18
Cisplatina	2,40±0,20*	19,90±4,20	15,0±1,40	11,74±1,20

* Ref.⁸⁵

FIGURA 4.26: Dados de IC₅₀ (μmol·L⁻¹) para os compostos sintetizados



Os dados da TABELA 4.10 mostram que os ligantes livres (CSC e BSC) não apresentaram ação inibitória quando comparados aos complexos metálicos, com valores de IC₅₀ superiores a 50 μmol·L⁻¹. Já os complexos sintetizados apresentaram atividade inibitória frente as linhagens celulares testadas. Em sua maioria os complexos de Ag(I) foram mais ativos que a cisplatina e apresentaram um melhor índice de seletividade.

Os complexos bisquelatos apresentaram valores de IC₅₀ maiores que os complexos contendo ligante fosfínico (CAP e BAP), estes complexos foram de 2 a 16 vezes mais ativos do que os complexos bisquelatos (CCA e BBA). Tal

observação pode estar relacionada ao aspecto lipofílico dos grupos fosfínicos o que garante aos seus complexos uma maior chance de penetração nas células⁴¹. Entre os complexos fosfínicos a presença do ligante semicarbazona teve pouca influência nos valores de IC₅₀, entretanto, os complexos contendo o ligante CSC apresentaram menores valores de IC₅₀.

O índice de seletividade (IS), é um parâmetro amplamente aceito usado para avaliar a capacidade seletiva *in vitro* de um composto⁸⁶. O IS de um composto é calculado pela razão entre os valores de IC₅₀ de duas linhagens de células diferentes, preferencialmente uma não tumoral e outra tumoral, $IS = [IC_{50} \text{ Não tumoral}] / [IC_{50} \text{ Tumoral}]$ ⁸⁶. Altos valores de IS são ideais (>4), pois mostram o potencial de preferência do composto pelas células tumorais em comparação as células não tumorais. Com isso é possível comparar a seletividade dos compostos frente a um metalofármaco padrão, como a cisplatina, na TABELA 4.11 são apresentados os valores de IS para as linhagens estudadas.

TABELA 4.11: Índice de seletividade para as linhagens celulares estudadas.

Compostos	PNT2/DU145	PNT2/MCF7	PNT2/MDA-MB-231
BBA	3,13	13,77	8,26
BAP	0,91	0,99	1,13
CCA	1,07	4,08	1,19
CAP	0,93	0,96	1,52
Cisplatina	0,78	0,59	4,89

Os IS obtidos, mostraram que todos os complexos sintetizados apresentaram baixa seletividade, próximo aos valores encontrados para o fármaco padrão, com exceção do complexo BBA que apresentou valores de IS superiores a 3 para todas as linhagens celulares, e o complexo CCA com bom IS para linhagem MCF7. Isso mostra que para as linhagens de células avaliadas esses complexos possuem boa seletividade e considerável ação antitumoral. Adicionalmente, percebe-se uma preferência de forma geral dos complexos pelas linhagens de próstata, maiores estudos devem ser realizados para se compreender tal observação.

Os valores de IC₅₀ encontrados referentes as linhagens de mama não variaram significativamente, mesmo sendo a MDA-MB-231 sabidamente uma

célula de mais difícil tratamento. Isso indica que os compostos podem não depender de uma sinalização, o que está de acordo com os baixos valores de IS encontrados, uma vez que tais compostos não demonstram significativa preferência por alguma das linhagens testadas.

Vale destacar, que as concentrações inibitórias de 50% da viabilidade celular frente as linhagens de mama formam extremamente menores do que os valores apresentados pela cisplatina.

4.8 - Interação com DNA

O DNA é uma biomolécula essencial as células de todos os organismos vivos, possuindo funções fundamentais como de carregar as informações genéticas e a síntese de proteínas⁵⁸. Os fármacos que são utilizados clinicamente, têm o DNA como alvo de ação. Um exemplo é o metalofármaco *cisplatina*⁸⁷.

Os estudos de interação com DNA são importantes para o entendimento e proposição de possíveis mecanismos de ação de novos fármacos. Existem dois principais modos de interação fármaco-DNA, sendo eles as interações covalentes ou não covalentes⁵⁸.

As interações covalentes, como o nome indica, ocorre quando um composto se liga covalentemente ao DNA, nas bases nitrogenadas ou nos grupos fosfatos⁵⁸. As interações não covalentes podem ocorrer de forma eletrostática, onde as interações ocorrem entre cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA; por intercalação, podendo ocorrer quando grupos heterocíclicos planares permeiam espaços entre as bases nitrogenadas do DNA; Interação por sulco do DNA, geralmente ocorrem de forma fraca, por forças de Van der Waals^{58,88}. Métodos como, titulação espectroscópica, ensaio de mobilidade eletroforética do DNA, dicróismo circular dentre outras técnicas, são utilizadas para se estudar esses mecanismos de interação composto-DNA.

O DNA é composto por bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), uma molécula de açúcar (desoxirribose) e grupos fosfato. As ligações covalentes entre os grupos fosfato e as desoxirriboses formam a estrutura primária do DNA

enquanto que as ligações de hidrogênio promovidas entre as bases nitrogenadas complementares atribuem uma estrutura helicoidal para o DNA, classificada como estrutura secundária. Desta maneira, o DNA pode apresentar 3 conformações de dupla-hélice: α -DNA, β -DNA e ζ -DNA. Em solução comumente o DNA apresenta-se na conformação β .

4.8.1 - Titulação espectroscópica

A titulação espectroscópica por UV-visível é uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a estabilidade do DNA e suas interações com complexos metálicos^{61,88}. Por apresentar grupos cromóforos em suas bases nitrogenadas, o DNA expressa uma banda intensa de absorção em 260 nm⁸⁸. Desta forma, se houver alguma interação entre complexo e DNA, se espera que esta banda sofra deslocamentos possíveis de serem monitorados pela técnica de Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis⁸⁸.

Nas FIGURA 4.27, FIGURA 4.28, FIGURA 4.29, FIGURA 4.30 são apresentados os dados experimentais dos ensaios de interação com DNA por titulação espectroscópica.

FIGURA 4.27: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo BBA em presença de quantidades crescentes de DNA.

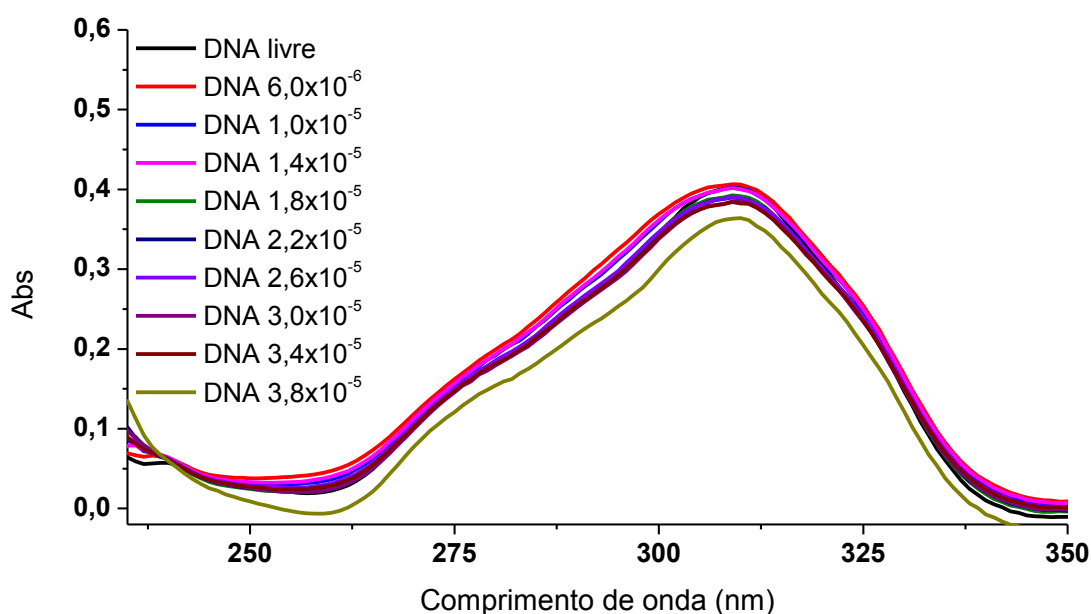


FIGURA 4.28: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo BAP em presença de quantidades crescentes de DNA.

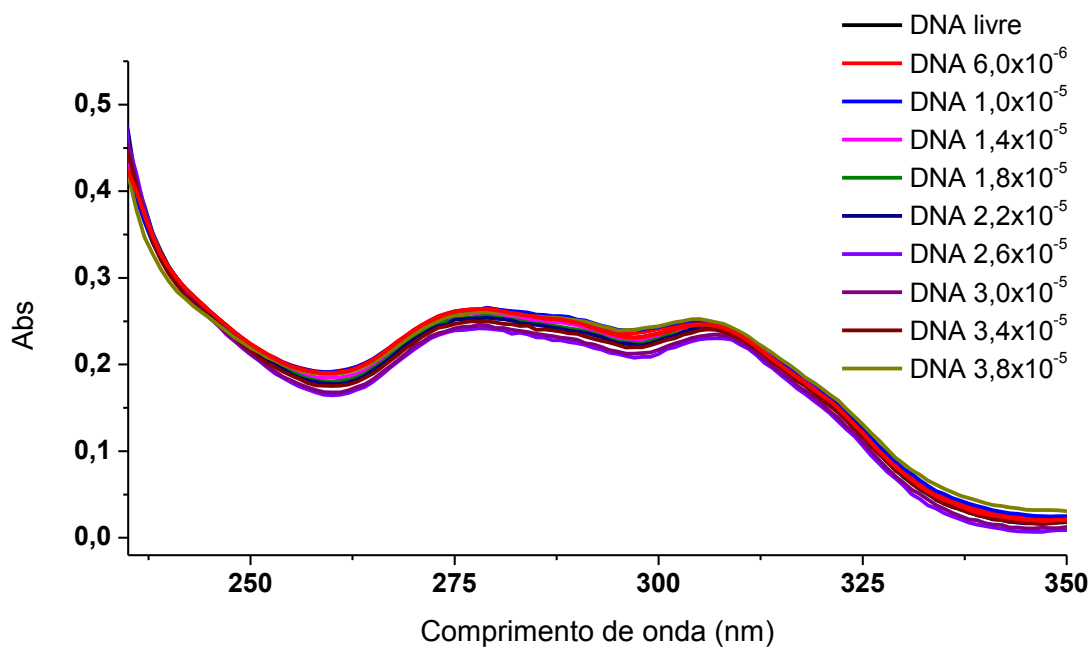


FIGURA 4.29: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo CCA em presença de quantidades crescentes de DNA.

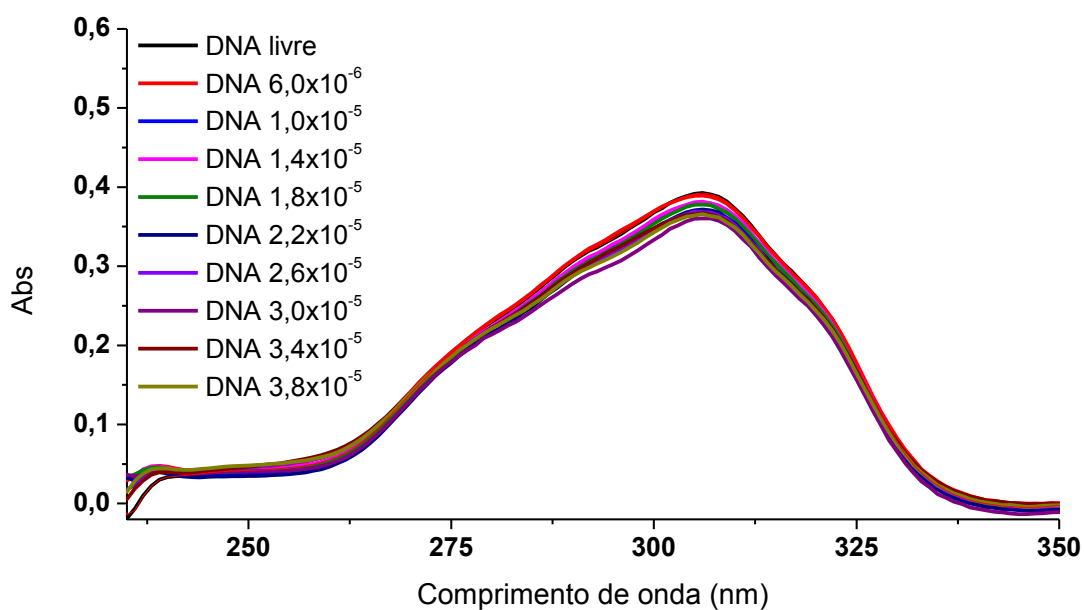
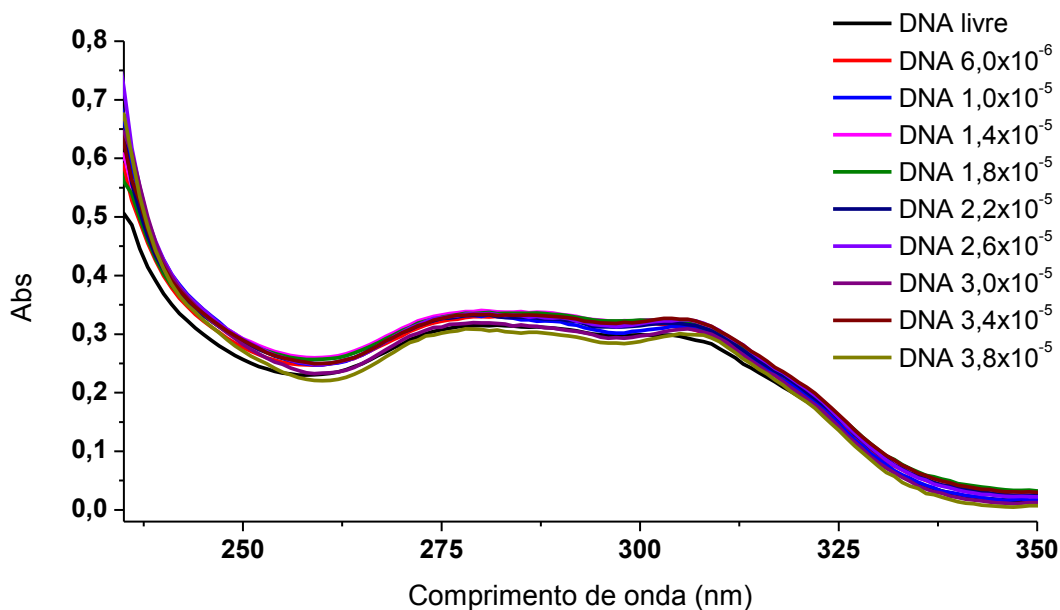


FIGURA 4.30: Espectros obtidos pelo experimento de titulação espectrofotométrica complexo CAP em presença de quantidades crescentes de DNA.



Como pode-se observar nos espectros do experimento de titulação espectrofotométrica, com a adição crescente de cada alíquota do DNA aos complexos, não houve alterações no espectro do complexo, indicando a uma fraca ou não interação dos compostos com o DNA.

4.8.2 - Dicroísmo circular (CD)

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica extremamente sensível quanto a detecção de alterações na estrutura secundária do DNA em solução^{36,60}. O CT-DNA, normalmente empregado, apresenta duas bandas de absorção no espectro de CD, sendo uma em 277 nm (banda positiva) e outra em 243 nm (banda negativa)^{36,58,60}. A primeira se refere ao empilhamento das bases nitrogenadas e a segunda é característica ao β -DNA. Estas bandas são bastante sensíveis, e assim podem ser utilizadas para identificar alterações conformacionais na estrutura do DNA em função da presença de um determinado composto^{36,60}. No caso de interações não-covalentes de natureza fraca, como interações por sulco, o espectro de CD sofrerá pouca ou nenhuma alteração com relação ao DNA livre. Já no caso de interações de natureza mais forte, como interação por intercalação, as alterações no espectro são bastante significativas^{36,60}. Nas FIGURA 4.31, FIGURA 4.32, FIGURA 4.33 e FIGURA

4.34 são apresentados os dados experimentais dos ensaios de interação com DNA por dicroísmo circular.

FIGURA 4.31: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo BBA.

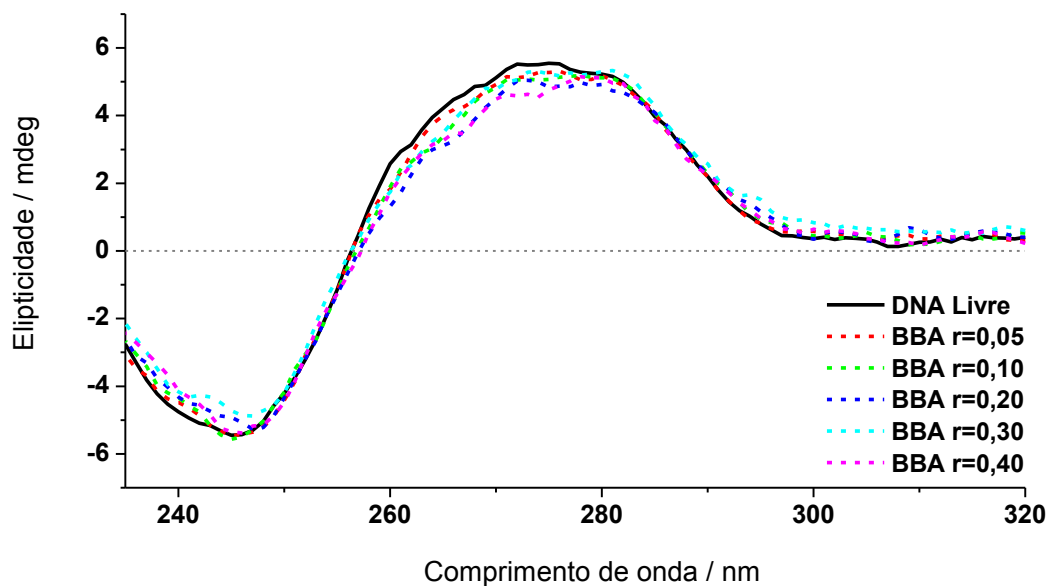


FIGURA 4.32: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo BAP

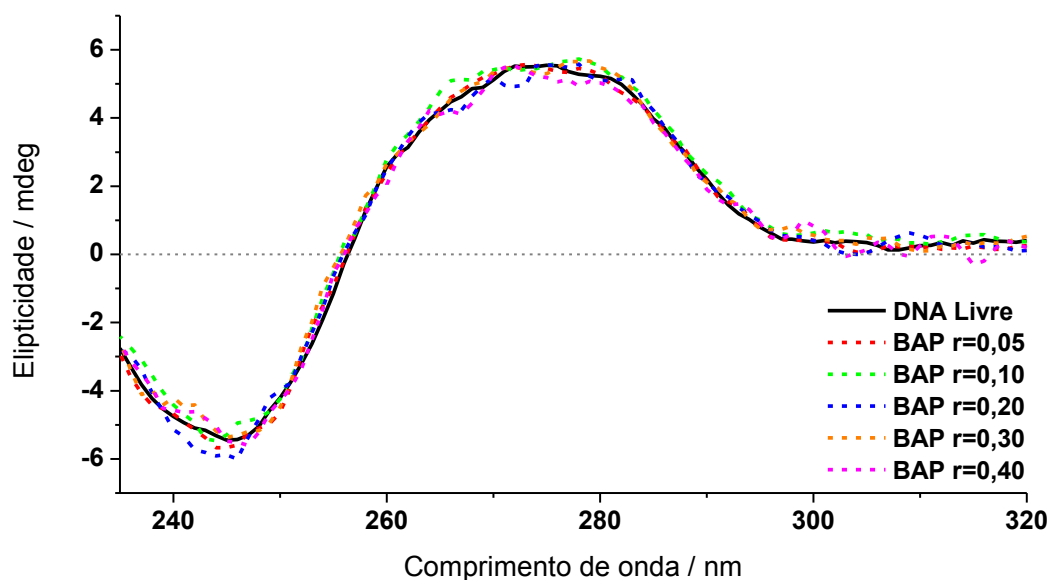


FIGURA 4.33: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo CCA

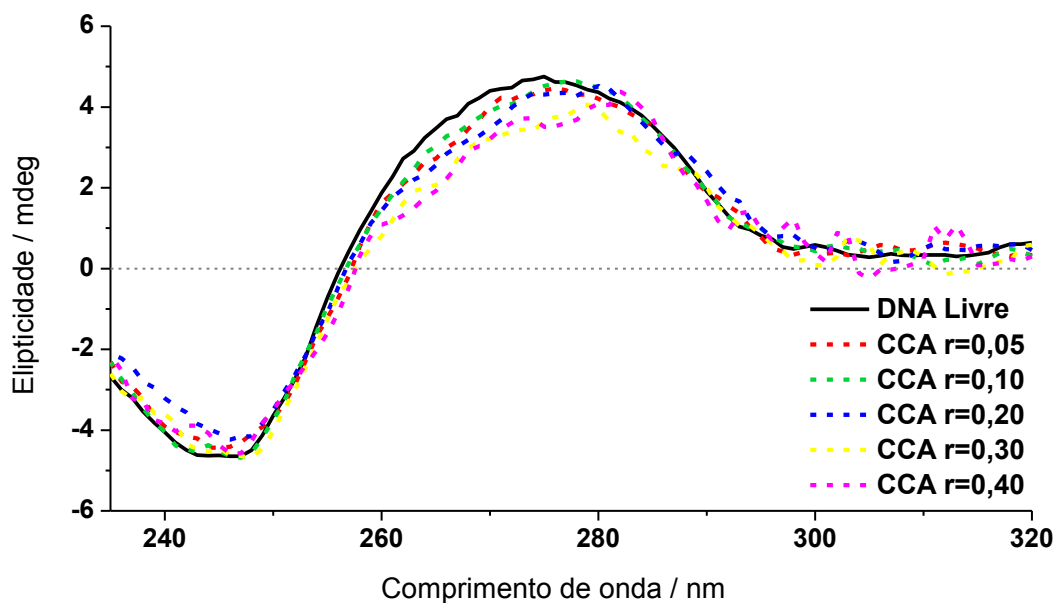
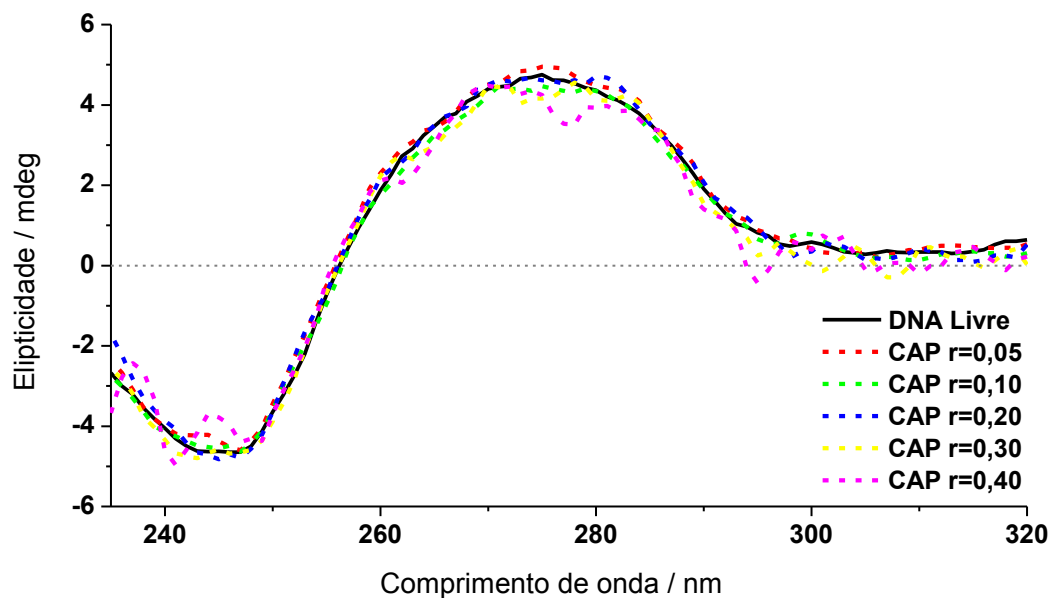


FIGURA 4.34: Espectros de CD do DNA em presença de quantidades crescentes da concentração do complexo CAP.



Da mesma forma em que não foram observadas alterações nas bandas do DNA na titulação espectroscópica, o mesmo ocorreu para os espectros de dicroísmo circular. Não havendo alterações nas bandas característica do CT-DNA nas regiões de 277 nm e 243 nm. Indicando a não modificação da

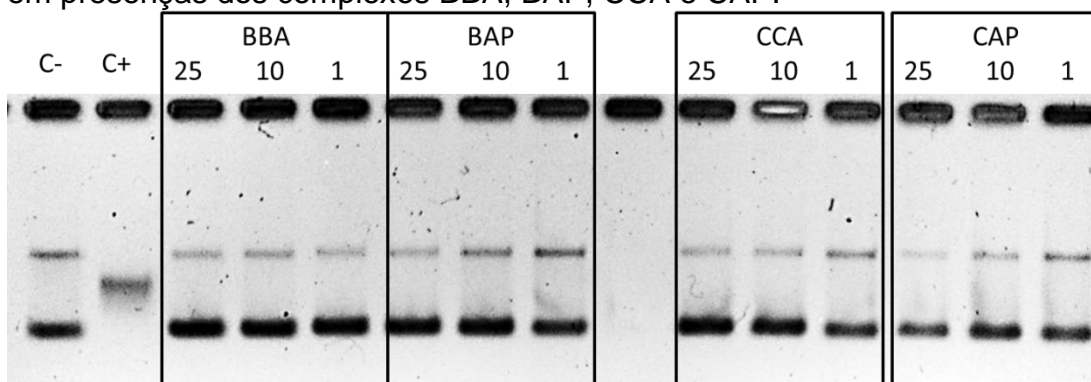
estrutura secundária do DNA quando adicionados quantidades crescentes dos compostos no DNA.

4.8.3 - Interação com plasmídeo superenovelado

O ensaio de mobilidade eletroforética do DNA resume-se a estudar a capacidade de um composto interagir com o DNA. Esse experimento baseia-se na diferença de mobilidade do DNA de acordo com seu tamanho ou forma⁸⁸. O plasmídeo superenovelado é covalentemente fechado, sendo uma forma circular do DNA. Dependendo das condições ela pode se converter a uma forma mais relaxada. A forma superenovelada é mais compacta e, conseqüentemente permeia mais facilmente as cavidades do gel, enquanto que a forma relaxada é mais volumosa, o que reduz sua mobilidade de permeação^{88,89}.

O experimento se inicia com a incubação do plasmídeo superenovelado junto a diferentes concentrações do composto, e em seguida é submetido à eletroforese⁸⁸. Se houver interação do composto com o DNA, haverá relaxação da forma superenovelada, o que conseqüentemente afetará a velocidade de migração no gel^{58,88,89}. No experimento são feitos controles, positivo e negativo: no controle negativo é feita a incubação apenas do plasmídeo sem adição de nenhum interferente; no controle positivo o fármaco padrão (cisplatina) é incubado junto ao DNA superenovelado. Sabe-se que a cisplatina interage covalentemente com as bases nitrogenadas do plasmídeo, resultando em quebra ou relaxação do plasmídeo. Dado isso espera-se que exista mudanças na mobilidade eletroforética do controle incubado com o fármaco padrão (controle +). A FIGURA 4.35 mostra a imagem resultante dos ensaios de mobilidade eletroforética.

FIGURA 4.35: Ensaio de mobilidade eletroforética do DNA superenovelado em presenças dos complexos BBA, BAP, CCA e CAP.



* C- = controle negativo; C+ = controle positivo - cisplatina [$5 \cdot 10^{-6}$]; concentrações em $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Pelo ensaio de mobilidade eletroforética, pode-se observar pela imagem na FIGURA 4.35 que a adição dos complexos não alterou a mobilidade do DNA superenovelado, estando a mobilidade do DNA em presença dos compostos inalterada com relação ao ensaio controle.

Assim o conjunto de dados das três técnicas que avaliaram as possíveis interações do DNA com os complexos sintetizados convergem para a existência de interações de natureza fraca ou a não interação entre os complexos e o DNA. Esta condição pode indicar que o alvo terapêutico envolvido na ação inibitória apresentada pelos complexos frente as linhagens tumorais testadas, possa não ser o DNA.

4.9 - Inibição Bacteriana

Os testes foram realizados com os seis compostos sintetizados a fim de comparar a atividade antibacteriana de cada um deles. Foram utilizadas quatro cepas bacterianas distintas, sendo duas cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813) e duas cepas de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* sorotipo O157:H7 e *Salmonella thipy* ATCC 6539). Essas cepas foram escolhidas devido a sua grande importância médica e por serem as mais relevantes em casos de infecções hospitalares, além de já apresentarem resistência aos medicamentos convencionais⁹⁰. Os resultados obtidos foram tratados e os valores, em porcentagem de inibição são apresentados nas tabelas abaixo.

TABELA 4.12: Porcentagem de inibição dos compostos para *Staphylococcus aureus* ATCC 14458. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 μM testadas.

Compostos	160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	70,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
CAP	62,7% \pm 9,9%	68,7% \pm 7,5%	79,2% \pm 6,9%
BAP	61,4% \pm 8,5%	72,5% \pm 1,9%	-
BBA	84,2% \pm 1,2%	82,1% \pm 0,6%	-
CCA	84,6% \pm 1,6%	83,2% \pm 2,3%	-

TABELA 4.13: Porcentagem de inibição dos compostos para *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ testadas.

Compostos	160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	70,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
CAP	64,7% \pm 4,0%	73,5% \pm 4,1%	79,0% \pm 5,1%
BAP	45,4% \pm 5,4%	32,5% \pm 17,8%	-
BBA	82,6% \pm 1,3%	81,9% \pm 0,6%	37,5% \pm 1,3%
CCA	82,7% \pm 1,1%	82,2% \pm 0,8%	37,3% \pm 5,8%

TABELA 4.14: Porcentagem de inibição dos compostos para *Escherichia coli* sorotipo O157:H7. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ testadas.

Compostos	160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	70,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
CAP	68,7% \pm 7,0%	66,8% \pm 9,8%	74,9% \pm 9,1%
BAP	72,2% \pm 1,2%	72,2% \pm 1,2%	-
BBA	64,3% \pm 14,2%	-	-
CCA	75,1% \pm 11,2%	-	-

TABELA 4.15: Porcentagem de inibição dos compostos para *Salmonella thipy* ATCC 6539. Estão apresentadas as médias, em porcentagem, assim como o desvio padrão, para as concentrações de 160, 70,4 e 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ testadas.

Compostos	160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	70,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
CAP	64,49% \pm 9,1%	70,30% \pm 12,4%	81,64% \pm 4,1%

BAP	74,2% ± 11,2%	75,9% ± 13,2%	-
BBA	81,43% ± 2,5%	82,8% ± 2,3%	27,7% ± 3,8%
CCA	81,2% ± 3,4%	82,4% ± 2,6%	81,8% ± 1,4%

Apesar de terem sido realizados testes em concentrações inferiores as apresentadas nas TABELA 4.12 TABELA 4.15 (160 a 0,09 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a menor concentração que demonstrou inibição do crescimento microbiano foi de 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para as bactérias Gram-positivas os compostos BAP, BBA e CCA apresentaram porcentagem de inibição de 70,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto o composto CAP foi de 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os compostos BBA e CCA apresentam inibição na concentração de 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para o microrganismo *Streptococcus agalactiae*. Porém, os valores ficaram abaixo de 50% como pode ser visto na TABELA 4.13.

Para as bactérias Gram-negativas somente o composto CAP apresentou porcentagem de inibição de 31,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, com inibição acima de 70%. O valor de inibição para BAP foi de 70,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e para os compostos BBA e CCA o inibição foi de 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (TABELA 4.14 e TABELA 4.15).

O composto CAP apresentou porcentagem de inibição semelhante para todas as bactérias testadas, com inibição acima de 70%. Este resultado indica que este composto representa um promissor agente antimicrobiano, com amplo espectro de ação uma vez que consegue inibir bactérias Gram-positivas e negativas.

A parede celular de bactérias Gram-positivas apresenta uma composição mais simples, composta basicamente por peptidoglicano e proteínas. Este motivo justifica a maior inibição e melhor ação dos compostos para *S. aureus* e *S. agalactiae*. Já as bactérias Gram-negativas apresentam em sua parede celular uma espessa camada de lipopolissacarídeos (LPS) acima da camada de peptidoglicano, esta barreira pode dificultar a ação de compostos antimicrobianos. Este efeito também foi observado com os compostos testados, uma vez que a inibição ocorreu em concentrações maiores para *E. coli* e *S. thipy*.

5 - Considerações finais

5.1 - Conclusões

Neste trabalho foram planejados e sintetizados quatro novos complexos de prata(I), os quais foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas de IV, RMN, UV-vis, análise elementar e condutividade molar. Por essas técnicas, foi possível investigar a estrutura dos complexos formados assim como suas propriedades.

Com os ensaios de citotoxicidade, verificou-se que os quatro complexos estudados são potenciais inibidores de células tumorais. Foi observado que os complexos com ligante trifenilfosfina, foram mais ativos do que os complexos bisquelatos. Essa constatação pode ser apoiada pelo fato de que, as fosfinas por si só já possuem atividade biológica e, quando coordenadas a um centro metálico, podem potencializar essa atividade. Outra consideração é que as fosfinas podem ter aumentado a lipofilicidade dos complexos.

Os valores de IS, para as linhagens de células de próstata, mostraram que o complexo BBA possui uma seletividade maior para câncer de próstata em comparação aos outros complexos sintetizados. Isso significa que esse complexo tende a ser mais citotóxico frente a células de câncer do que células não cancerosas, o que é um ponto bastante positivo quando se trata da busca por novos agentes antitumorais.

Pode se afirmar que o alvo citotóxico envolvido na ação dos compostos, muito provavelmente não é o DNA, devido as técnicas de interação complexo-DNA mostrarem que não ocorre interação, ou se ocorrer são de natureza muito fraca. Sendo que para se gerar uma resposta de apoptose na célula, causada por interações com o DNA, essas interações devem ser mais fortes. Quanto ao mecanismo e alvo citotóxico dos complexos sintetizados, ainda não se tem um alvo conhecido no momento, sendo necessário a realização de outros estudos, com alvos diferentes.

Quanto aos ensaios de inibição bacteriana, pode-se dizer que não houve valores expressivos na porcentagem de inibição, que mostrassem que os complexos fossem ativos na inibição das linhagens bacterianas testadas. Porém em comparação com o trabalho de Khalaji³⁹ os complexos em geral, em

destaque o CAP apresentou-se mais ativo do que o análogo de tiossemicarbazona sintetizado pelo autor, com porcentagens de inibição semelhantes tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas (inibição acima de 70%) com concentração mínima de $160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para os complexos sintetizados e $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,11 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) para o composto mais ativo do autor.

5.2 - Perspectivas Futuras

Este trabalho serve como ponto de partida para novos estudos quanto a atividade biológica dos compostos sintetizados. Para maior compreensão do sistema demais estudos deverão ser realizados. Tais como: lipofilicidade, capaz de fornecer informação sobre absorção, distribuição, metabolização e excreção em um meio celular; utilizar outras linhagens celulares tumorais e não tumorais para ampliar o conhecimento sobre o espectro de ação dos compostos; avaliação da morte celular, com intuito de analisar o tipo de morte (necrótica ou apoptótica) causada pelos complexos; avaliar outras possíveis biomoléculas como alvo terapêutico.

6 - Referências bibliográficas

- (1) Lippard, S. J. Bioinorganic Chemistry: A Maturing Frontier. *Science* (80-.). **1993**, 261 (5122), 699–700. <https://doi.org/10.1126/science.8342037>.
- (2) Bertini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S. J.; Selverstone Valentine, J.; Lippard, S.; Valentine, J. *Bioinorganic Chemistry*; University Science Books: Mill Valley, **1994**.
- (3) Gielen, M.; Tiekink, E. R. T. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*; John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
- (4) Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M. E. Metal Complexes in Cancer Therapy – An Update from Drug Design Perspective. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, 11, 599–616. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>.
- (5) Fischer, J.; Ganellin, C. R. *Analogue-Based Drug Discovery*; WILEY, 2006.
- (6) Organization, W. H. Cancer <https://www.who.int/cancer/en/> (accessed Jul 9,

- 2019).**
- (7) Instituto Nacional de Câncer (INCA). Câncer: Tratamento <https://www.inca.gov.br/tratamento> (accessed Jul 9, **2019**).
 - (8) Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>.
 - (9) Lewis, M. G.; DaFonseca, S.; Chomont, N.; Palamara, A. T.; Tardugno, M.; Mai, A.; Collins, M.; Wagner, W. L.; Yalley-Ogunro, J.; Greenhouse, J.; et al. Gold Drug Auranofin Restricts the Viral Reservoir in the Monkey AIDS Model and Induces Containment of Viral Load Following ART Suspension. *AIDS* **2011**, *25* (11), 1347–1356. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328347bd77>.
 - (10) ATDSR. Public Health Statement: Silver. **1990**, 5.
 - (11) Clement, J. L.; Jarrett, P. S. Antibacterial Silver. *Met. Based. Drugs* **2007**, *1* (5–6), 467–482. <https://doi.org/10.1155/mbd.1994.467>.
 - (12) Alexander, J. W. History of the Medical Use of Silver. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **2009**, *10* (3), 289–292. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>.
 - (13) Knetsch, M. L. W.; Koole, L. H. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3* (1), 340–366. <https://doi.org/10.3390/polym3010340>.
 - (14) Lee, J. D. *CONCISE INORGANIC CHEMISTRY*, 4th ed.; Hall, C. &, Ed.; **1991**.
 - (15) Howe, P. D.; Dobson, S. *Concise International Chemical Assessment Document 44: Silver and Silver Compounds: Environmental Aspects*; Geneva, 2002.
 - (16) Rosenkranz, H. S.; Rosenkranz, S. Silver Sulfadiazine: Interaction with Isolated Deoxyribonucleic Acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2* (5), 373–383. <https://doi.org/10.1128/AAC.2.5.373>.
 - (17) Meakins, J. L. Silver and New Technology: Dressings and Devices. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **2009**, *10* (3), 293–296. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9942>.
 - (18) Nakane, T.; Gomyo, H.; Sasaki, I.; Kimoto, Y.; Hanzawa, N.; Teshima, Y.; Namba, T. New Antiaxillary Odour Deodorant Made with Antimicrobial Ag-Zeolite (Silver-Exchanged Zeolite). *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28* (4), 299–309. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00322.x>.
 - (19) Marcato, P. D.; Nakasato, G.; Brocchi, M.; Melo, P. S.; Huber, S. C.; Ferreira, I. R.; Alves, O. L.; Durán, N. Biogenic Silver Nanoparticles: Antibacterial and Cytotoxicity Applied to Textile Fabrics. *J. Nano Res.* **2012**, *20*, 69–76. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/jnanor.20.69>.
 - (20) Ward, L. S. Proteção extra: Tecidos antimicrobianos que também repelem líquido podem proporcionar mais segurança para profissionais da saúde <https://revistapesquisa.fapesp.br/2016/08/19/protacao-extra/> (accessed Jun 29, **2019**).
 - (21) Thornton, L.; Dixit, V.; Assad, L. O. N.; Ribeiro, T. P.; Queiroz, D. D.; Kellett, A.; Casey, A.; Colleran, J.; Pereira, M. D.; Rochford, G.; 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.* **2016**, *159*, 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.024>.

- (22) McKeage, M. J.; Papathanasiou, P.; Salem, G.; Sjaarda, A.; Swiegers, G. F.; Waring, P.; Wild, S. B. Antitumor Activity of Gold(I), Silver(I) and Copper(I) Complexes Containing Chiral Tertiary Phosphines. *Met. Based. Drugs* **1998**, *5* (4), 217–223. <https://doi.org/10.1155/MBD.1998.217>.
- (23) Eloy, L.; Jarrousse, A. S.; Teyssot, M. L.; Gautier, A.; Morel, L.; Jolival, C.; Cresteil, T.; Roland, S. Anticancer Activity of Silver-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Caspase-Independent Induction of Apoptosis via Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF). *ChemMedChem* **2012**, *7* (5), 805–814. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200055>.
- (24) Banti, C. N.; Papatriantafyllopoulou, C.; Manoli, M.; Tasiopoulos, A. J.; Hadjikakou, S. K. Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (17), 8681–8696. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01241>.
- (25) Hadjikakou, S. K.; Ozturk, I. I.; Xanthopoulou, M. N.; Zachariadis, P. C.; Zartilas, S.; Karkabounas, S.; Hadjiliadis, N. Synthesis, Structural Characterization and Biological Study of New Organotin(IV), Silver(I) and Antimony(III) Complexes with Thioamides. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (5–6), 1007–1015. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.027>.
- (26) Banti, C. N.; Kourkoumelis, N.; Tsiafoulis, C. G.; Skoulika, S.; Hadjikakou, S. K. Silver(I) Complexes of Methyl Xanthate against Human Adenocarcinoma Breast Cancer Cells. *Polyhedron* **2017**, *121*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.09.056>.
- (27) Poyraz, M.; Banti, C. N.; Kourkoumelis, N.; Dokorou, V.; Manos, M. J.; Simčič, M.; Golič-Grdadolnik, S.; Mavromoustakos, T.; Giannoulis, A. D.; Verginadis, I. I.; et al. Synthesis, Structural Characterization and Biological Studies of Novel Mixed Ligand Ag(I) Complexes with Triphenylphosphine and Aspirin or Salicylic Acid. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *375* (1), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.04.032>.
- (28) Tanwar, J.; Das, S.; Fatima, Z.; Hameed, S. Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2014**, *2014*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/541340>.
- (29) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principles of Biochemistry*, 6th ed.; SCHULTZ, L., MORAN, S., TONTONOZ, M., Eds.; W. H. Freeman and Company, 2012.
- (30) Yelin, I.; Kishony, R. Antibiotic Resistance. *Cell* **2018**, *172* (5), 1136–1136.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>.
- (31) Li, B.; Webster, T. J. Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopedic Infections. *J. Orthop. Res.* **2017**, *36* (1), 22–32. <https://doi.org/10.1002/jor.23656>.
- (32) ANVISA. Plano Nacional Para a Prevenção e o Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde e Resistência Microbiana. **2017**, 1–84. <https://doi.org/10.1042/BST20150223>.
- (33) ANVISA. Rede RM: Resistência Microbiana Em IPCSL Relacionada a CVC Em UTI (2012). *Bol. Inf. - Segurança do Paciente e Qual. em Serviços Saúde* **2014**, *IV* (7), 1–26.
- (34) Ministério da Saúde. Técnica de Coloração de Gram. *Programa Nac. Doenças*

- Sex. Transm. e AIDS* **2001**, 67.
- (35) Beveridge, T. J.; Davies, J. A. Cellular Responses of *Bacillus Subtilis* and *Escherichia Coli* to the Gram Stain. *J. Bacteriol.* **1983**, 156 (2), 846–858.
- (36) Rehman, S. U.; Sarwar, T.; Husain, M. A.; Ishqi, H. M.; Tabish, M. Studying Non-Covalent Drug–DNA Interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, 576, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.024>.
- (37) WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. *WHO Libr. Publ. data* **2015**, 1–28.
- (38) WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed Jul 9, **2019**).
- (39) Dehno Khalaji, A.; Shahsavani, E.; Feizi, N.; Kucerakova, M.; Dusek, M.; Mazandarani, R. Silver(I) Thiosemicarbazone Complex [Ag(Catsc)(PPh₃)₂]NO₃: Synthesis, Characterization, Crystal Structure, and Antibacterial Study. *Comptes Rendus Chim.* **2017**, 20 (5), 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.09.001>.
- (40) Mohd Sofyan, N. R. F.; Nordin, F. J.; Mohd Abd Razak, M. R.; Abdul Halim, S. N. 'Ain; Mohd Khir, N. A. F.; Muhammad, A.; Rajab, N. F.; Sarip, R. New Silver Complexes with Mixed Thiazolidine and Phosphine Ligands as Highly Potent Antimalarial and Anticancer Agents. *J. Chem.* **2018**, 2018 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/8395374>.
- (41) Berners-Price, S. J.; Sadler, P. J. Phosphines and Metal Phosphine Complexes: Relationship of Chemistry to Anticancer and Other Biological Activity; **1988**; pp 27–102. https://doi.org/10.1007/3-540-50130-4_2.
- (42) Minigh, J. Auranofin. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*; Elsevier, **2007**; pp 1–6. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61268-1>.
- (43) Shaw, C. F. Gold-Based Therapeutic Agents. *Chem. Rev.* **1999**, 99 (9), 2589–2600. <https://doi.org/10.1021/cr980431o>.
- (44) Roder, C.; Thomson, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R D* **2015**, 15 (1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s40268-015-0083-y>.
- (45) Tardugno, M.; Chomont, N.; DaFonseca, S.; Yalley-Ogunro, J.; Greenhouse, J.; Collins, M.; Palamara, A. T.; Garaci, E.; Savarino, A.; Wagner, W. L.; et al. Gold Drug Auranofin Restricts the Viral Reservoir in the Monkey AIDS Model and Induces Containment of Viral Load Following ART Suspension. *Aids* **2011**, 25 (11), 1347–1356. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328347bd77>.
- (46) Jose, J.; Nair, A. K.; Kalarikkal, N.; Oluwafemi, O.; Thomas, S. Novel Bio Compactable Silver Nanowires and Nanocubes: An Effective Treatment against Carbapenem and Vancomycin Resistant Strains Isolated from Cancer Patients. *J. Saudi Chem. Soc.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.06.004>.
- (47) Palanimuthu, D.; Wu, Z.; Jansson, P. J.; Braidy, N.; Bernhardt, P. V.; Richardson, D. R.; Kalinowski, D. S. Novel Chelators Based on Adamantane-Derived Semicarbazones and Hydrazones That Target Multiple Hallmarks of Alzheimer's Disease. *Dalt. Trans.* **2018**, 47 (21), 7190–7205. <https://doi.org/10.1039/C8DT01099D>.

- (48) Abu-Dief, A. M.; Mohamed, I. M. A. A Review on Versatile Applications of Transition Metal Complexes Incorporating Schiff Bases. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2015**, *4* (2), 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.05.004>.
- (49) Venkatachalam, T. K.; Bernhardt, P. V.; Noble, C. J.; Fletcher, N.; Pierens, G. K.; Thurecht, K. J.; Reutens, D. C. Synthesis, Characterization and Biological Activities of Semicarbazones and Their Copper Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *162*, 295–308. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.04.006>.
- (50) Hania, M. M. Synthesis and Antibacterial Activity of Some Transition Metal Complexes of Oxime, Semicarbazone and Phenylhydrazone. *Asian J. Chem.* **2007**, *19* (3), 1897–1902.
- (51) Samus', N. M.; Gulya, A. P.; Tsapkov, V. I.; Chumakov, Y. M.; Roshu, T. Coordination Compounds of Cobalt, Nickel, Copper and Zinc with Thiosemicarbazone and 3-Phenylpropenal Semicarbazone. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76* (7), 1100–1105. <https://doi.org/10.1134/S1070363206070164>.
- (52) Zhai, X.; Bao, G.; Wang, L.; Cheng, M.; Zhao, M.; Zhao, S.; Zhou, H.; Gong, P. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 4-Phenoxy-6,7-Disubstituted Quinolines Possessing (Thio)Semicarbazones as c-Met Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (6), 1331–1345. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.003>.
- (53) Beraldo, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O Amplo Perfil Farmacológico e Usos Clínicos. *Quim. Nova* **2004**, *27* (3), 461–471. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300017>.
- (54) Popolin, C. P.; Reis, J. P. B.; Becceneri, A. B.; Graminha, A. E.; Almeida, M. A. P.; Corrêa, R. S.; Colina-Vegas, L. A.; Ellena, J.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2017**, *12* (9), e0183275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183275>.
- (55) Colina-Vegas, L.; Lucena Dutra, J.; Villarreal, W.; Neto, J. H. de A.; Cominetti, M. R.; Pavan, F.; Navarro, M.; Batista, A. A. Ru (II)/ Clotrimazole / Diphenylphosphine / Bipyridine Complexes : Interaction with DNA , BSA and Biological Potencial against Tumor Cell Lines and Mycobacterium ... *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *162* (September), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.023>.
- (56) Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Morel, L.; Gautier, A.; Garrido, S. S.; Mauro, A. E.; Frem, R. C. G.; Netto, A. V. G. DNA Binding, Topoisomerase Inhibition and Cytotoxicity of Palladium(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Thioureas. *Inorganica Chim. Acta* **2016**, *446*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.02.053>.
- (57) Nayab, P. S.; Pulaganti, M.; Chitta, S. K.; Rahisuddin. A New Isoindoline Based Schiff Base Derivative as Cu(II) Chemosensor: Synthesis, Photophysical, DNA Binding and Molecular Docking Studies. *J. Fluoresc.* **2015**, *25* (6), 1763–1773. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1664-4>.
- (58) 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.* **2013**, *124*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>.

- (59) Villarreal, W.; Colina-Vegas, L.; Visbal, G.; Corona, O.; Corrêa, R. S.; Ellena, J.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A.; Navarro, M. Copper(I)–Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (7), 3781–3793. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02419>.
- (60) Zsila, F. Apparent Circular Dichroism Signature of Stirring-Oriented DNA and Drug–DNA Complexes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1034–1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.009>.
- (61) Jaumot, J.; Gargallo, R. Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (14), 1900–1916. <https://doi.org/10.2174/138161212799958486>.
- (62) (US), N. C. for C. L. S. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard*; National Committee for Clinical Laboratory Standards, **2006**.
- (63) Geary, W. J. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, *7* (1), 81–122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).
- (64) Garcia Velho, R. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. *Programa Pós-Graduação em Química - UF* **2006**, 170.
- (65) Shriver, D.; Weller, M.; Overton, T.; Rourke, J.; Armstrong, F. *Inorganic Chemistry.*, 6th ed.; W. H. Freeman and Company: New York, **2014**.
- (66) Pavia, D. L. ; Lampman, G. M. ; Kriz, G. S. ; Vyvyan, J. R. *Introduction to Spectroscopy*, 5th ed.; Cengage Learning: Stamford, **2015**.
- (67) Silverstein, R. M. ; Webster, F. X. ; Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed.; WILEY, **2005**.
- (68) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part A: Theory and Applications*; **1978**. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s4104>.
- (69) Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; Griffiths, P. R., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2006**. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s4104>.
- (70) Lever, A. B. P. *Excited States and Reactive Intermediates: Photochemistry, Photophysics, and Electrochemistry*; American Chemical Society, **1986**.
- (71) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds PART B*, 6 Ed.; Griffiths, P. R., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2006**. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s4104>.
- (72) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; **1982**. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)93553-8](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)93553-8).
- (73) Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; **2004**; Vol. 8. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- (74) Samshuddin, S.; Butcher, R. J.; Yildirim, S. O.; Akkurt, M.; Narayana, B.; Yathirajan, H. S. (2E)-2-[(3E)-4-Phenylbut-3-En-2-Ylidene]-Hydrazinecarboxamide. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2012**,

- 68 (1). <https://doi.org/10.1107/S160053681105255X>.
- (75) Grim, S. O.; Yankowsky, A. W. Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies on Hydrobromides of Substituted Triarylphosphines and Other Derivatives. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (7), 1236–1239. <https://doi.org/10.1021/jo00427a030>.
- (76) Moedritzer, K.; Maier, L.; Groenweghe, L. C. D. Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Phosphorus Compounds. *J. Chem. Eng. Data* **1962**, *7* (2), 307–310. <https://doi.org/10.1021/je60013a043>.
- (77) Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C. *Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction*; University Science Books, **2009**.
- (78) Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *INORGANIC CHEMISTRY*, 4th ed.; Pearson, **2012**.
- (79) Kettle, S. F. A. *Physical Inorganic Chemistry*, 1st ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1996**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-25191-1>.
- (80) Kaljurand, I. Triphenylphosphine UV-vis tera.chem.ut.ee/~manna/spe/base.htm (accessed Jun 20, **2019**).
- (81) He, Y.; Zhu, Q.; Chen, M.; Huang, Q.; Wang, W.; Li, Q.; Huang, Y.; Di, W. The Changing 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) of Cisplatin: A Pilot Study on the Artifacts of the MTT Assay and the Precise Measurement of Density-Dependent Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7* (43). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12223>.
- (82) Beck, B.; Chen, Y.-F.; Dere, W.; Devanarayan, V.; Eastwood, B. J.; Farmen, M. W.; Iturria, S. J.; Iversen, P. W.; Kahl, S. D.; Moore, R. A.; et al. *Assay Operations for SAR Support*, **2004**.
- (83) Tolosa, L.; Donato, M. T.; Gómez-Lechón, M. J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*; Vinken, M., Rogiers, V., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, **2015**; Vol. 1250, pp 333–348. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
- (84) Langdon, S. P. *Cancer Cell Culture*; Humana Press: New Jersey, **2003**; Vol. 88. <https://doi.org/10.1385/1592594069>.
- (85) Dos Santos, E. R.; Corrêa, R. S.; Ribeiro, J. U.; Graminha, A. E.; Ellena, J.; Selistre-de-Araujo, H. S.; Batista, A. A. Ru(II)/Bisphosphine/Diimine/Amino Acid Complexes: Diastereoisomerism, Cytotoxicity, and Inhibition of Tumor Cell Adhesion to Collagen Type I. *J. Coord. Chem.* **2016**, *69* (23), 3518–3530. <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1244334>.
- (86) Pritchett, J. C.; Naesens, L.; Montoya, J. Treating HHV-6 Infections. In *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7*; Elsevier, **2014**; pp 311–331. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62703-2.00019-7>.
- (87) Chaires, J. B. Drug—DNA Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8* (3), 314–320. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80064-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80064-X).
- (88) Barra, C. V.; Netto, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and Their Tools of Analysis: An Approach to Metalintercalators. *Rev. Virtual Química* **2015**, *7* (6), 1998–2016. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>.
- (89) Calladine, C. R.; Drew, H. R.; Luisi, B. F.; Travers, A. A. *Understanding DNA: The*

Molecule & How It Works, 3rd ed.; Elsevier Academic Press, **2004**.

- (90) Loureiro, R. J.; Roque, F.; Teixeira Rodrigues, A.; Herdeiro, M. T.; Ramalheira, E. O Uso de Antibióticos e as Resistências Bacterianas: Breves Notas Sobre a Sua Evolução. *Rev. Port. Saúde Pública* **2016**, *34* (1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>.