

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

**Síntese e Caracterização de Complexos de Prata(I) com Ligantes
Quelantes Doadores N,N, N,O e N,S: Avaliação da
Citotoxicidade e Atividade Antibacteriana**

JOSENILTON DE JESUS SANTOS*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de DOUTOR EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

*bolsista CAPES

São Carlos - SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Josenilton de Jesus Santos, realizada em 28/08/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Silmar José Spinardi Franchi (UFSC)

Profa. Dra. Katia Mara de Oliveira (UnB)

Prof. Dr. Ivo Freitas Teixeira (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Gostaria de dedicar este trabalho
aos meus pais (Gabriel e Lindalva),
às minhas irmãs Daniela, Carla e Paula,
à minha companheira Karina,
pelo apoio em todos os momentos.
Muito obrigado a todos vocês!*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha, pela orientação, pela paciência e pela confiança depositada em mim ao longo desses anos de trabalho. Sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos meus queridos colegas de laboratório do CCQM, que tornaram cada dia de trabalho mais leve e enriquecedor: Josias, George, Mauro, Dário, Tamara, Victória, Nádiya, Nathan e Isabella. Muito obrigado pelas risadas, pelos debates científicos, pelos conselhos e por todos os momentos compartilhados. Vocês não só me ajudaram a aprender, mas também transformaram o laboratório em um segundo lar.

Aos IC's – Fernandinho, Letícia, Duda, Ana Julia e Lucas – pelo empenho, pela curiosidade e pela energia que trouxeram ao grupo. Foi um prazer acompanhar o crescimento de vocês e aprender juntos ao longo desse caminho.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação. Cada aula, conversa e orientação foi valiosa para o meu desenvolvimento.

Agradeço à Colega M.SC. Tamara Teixeira pela realização do ensaio de cultura 3D.

Agradeço à M.SC. Nadiya pela realização dos ensaios celulares, morfologia e clonogênico.

Agradeço à colega Dr^a Karine Zanotti que realizou os experimentos de espectrometria de massas.

Agradeço à Dr^a Janaína Brandão Seibert pelo tempo que se dispôs a me ensinar a realizar os ensaios microbiológicos.

Aos técnicos e funcionários do departamento, cujo trabalho muitas vezes passa despercebido, mas é essencial para o funcionamento de tudo. Muito obrigado pelo suporte, pela disponibilidade e pela ajuda em tantos momentos.

Aos órgãos de fomento aos FAPESP, CNPQ e em especial à CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado, que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, à minha família, base de todo o meu esforço:

- À minha mãe, Lindalva, e ao meu pai, Gabriel, por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Seu amor e incentivo foram a força que me trouxe até aqui.

- Às minhas irmãs Dani, Carla e Paula, pelo apoio incondicional (seja emocional, financeiro ou nas risadas que me mantêm sã!). Vocês são minhas maiores torcedoras e não há palavras para expressar o quanto sou grato por tê-las ao meu lado.

Este trabalho é fruto de muitas mãos, e a cada uma delas direciono meu mais sincero obrigado!

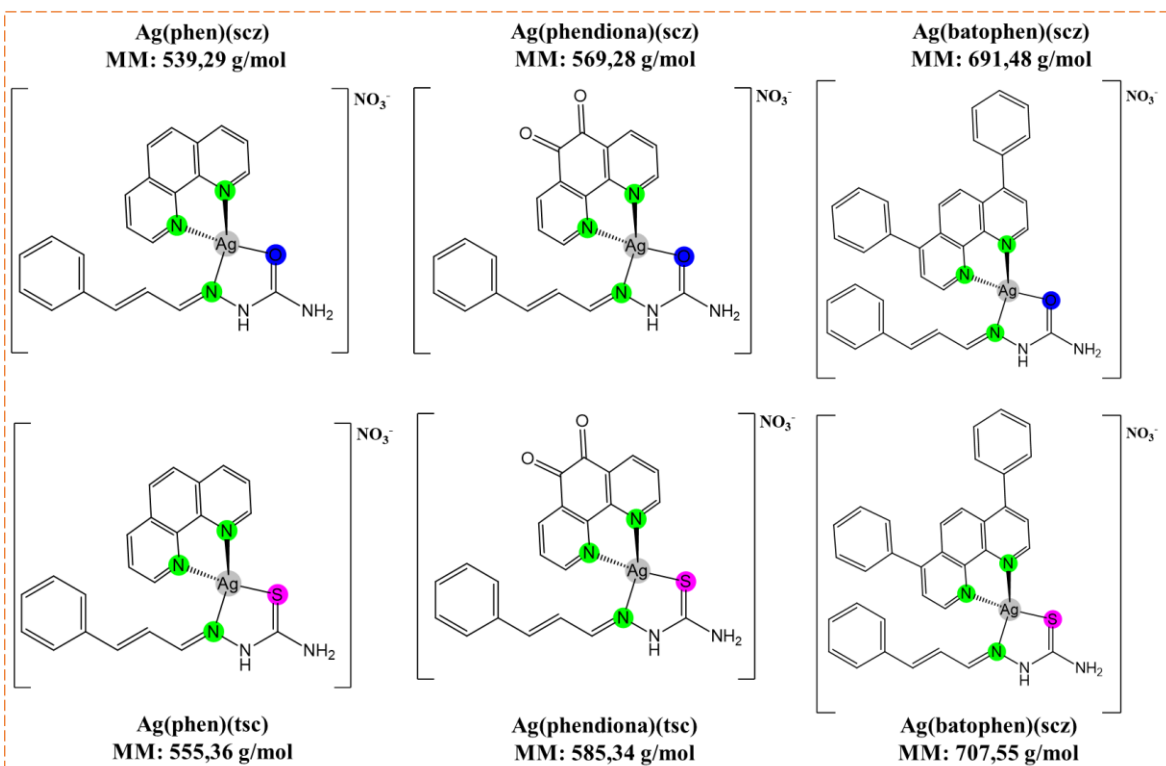
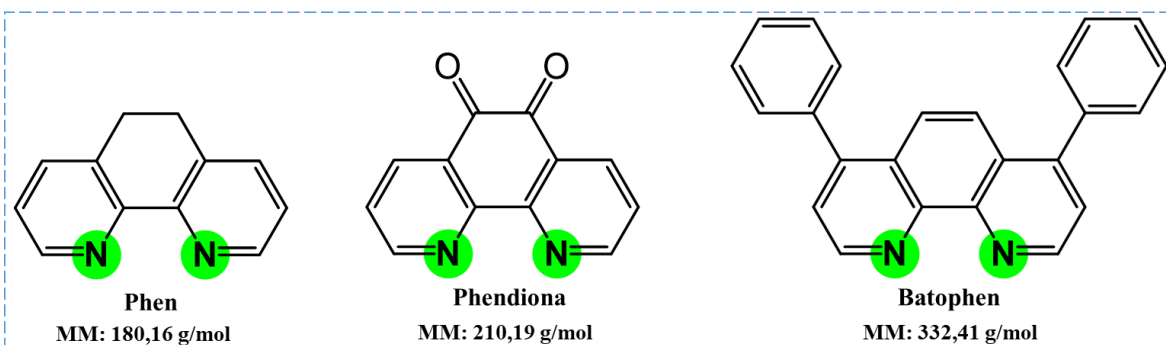
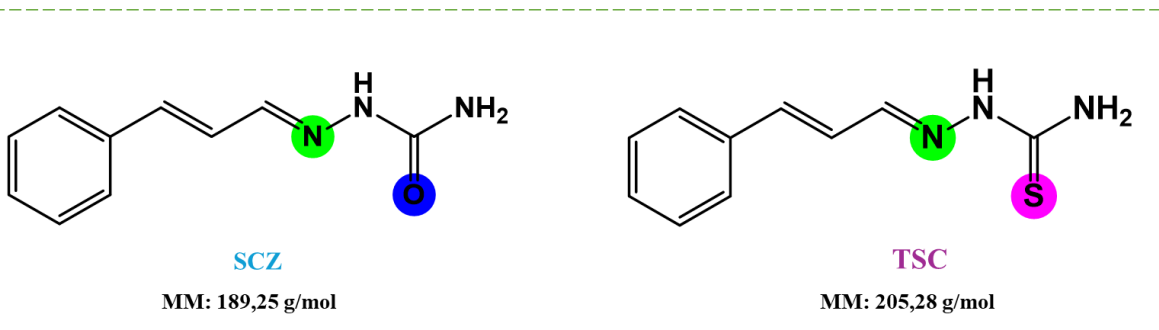
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AgNO ₃	Nitrato de prata
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina
batophen	4,7-difenil-1,10-fenantrolina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
FDA	Food and Drug Administration
TCLM	Transferência de Carga do Ligante para o Metal
phen	1,10-fenantrolina
phendiona	1,10-fenantrolina-5,6-diona
TSC	Tiossemicarbazona
SCZ	Semicarbazona
DMSO	Dimetilsulfóxido
HNO ₃	Ácido Nítrico
KBr	Brometo de Potássio
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro fetal bovino)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
pBR322	DNA plasmidial
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
MH	Mueller-Hinton
CC	Controle de Coloração
CM	Controle do meio de Cultura
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo

CS	Controle de surfactante
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
EC ₅₀	Concentração Efetiva de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
IS	Índice de Seletividade
CT-DNA	DNA de timo de boi. Do inglês: <i>Calf Thymus DNA</i>
Topo II α	Topoisomerase II α
Topo II β	Topoisomerase II β
IV	Infravermelho
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESI	Eletrospray Ionization
mg	Miligramas
mL	Mililitros
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
COSY	Correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
DEPT	Distortionless enhancement with polarization transfer
UV-Vis	Ultravioleta-visível
MRC-5	Célula não tumoral de pulmão humano
A549	Célula tumoral de pulmão humano
A2780	Célula tumoral de ovário humano
MDA-MB-231	Célula tumoral de mama humano triplo negativo
PI	Iodeto de Propídio
Kb	Constante de ligação
ppm	Partes por milhão

δ	Deslocamento químico nos espectros de RMN
ε	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda
cm^{-1}	Número de onda
μ	Micro (1×10^{-6})
μM	Micro molar
nm	Nanômetro
mM	Mili molar
m/z	Massa Carga
Hz	Hertz

ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES



LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de CIM para o ligante livre (catsc) e o complexo [Ag(catsc)(PPh ₃) ₂] <chem>NO3</chem>	18
TABELA 2: Parâmetros utilizados na ionização para a detecção dos padrões isotópicos.....	33
TABELA 3:Dados de RMN de ¹ H para os ligantes fenantrolínicos e constantes de acoplamento em DMSO-d ₆	51
TABELA 4: Valores experimentais e teóricos obtidos via análise elementar para os complexos de Ag(I).	53
TABELA 5: Dados de condutividade molar para as soluções dos complexos em DMSO na concentração 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	58
TABELA 6: Comparação das massas teóricas e das massas obtidas por espectrometria de massas (ESI-MS) para os complexos de Ag(I).	74
TABELA 7: Valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) para os ligantes livres e cisplatina em µM frente a linhagens tumoral e não tumoral no período de 48 h. ..	76
TABELA 8: Valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) para os complexos em µM, frente as linhagens tumoral e não tumoral em 48 h.	78
TABELA 9: Considerações gerais e principais destaques dos ligantes e dos complexos frente às linhagens tumorais e não tumorais.	80
TABELA 10:Valores de EC ₅₀ (µM) para promastigotas de Leishmania, IC ₅₀ (µM) em macrófagos RAW 264.7 e índice de seletividade (IS).	94

TABELA 11: Halo de inibição dos complexos nas cepas de K.Pneumoniae e S.Aureus	98
TABELA 12: Valores de Concentração Inibitória Mínima para os compostos e complexos metálicos de Ag(I) em $\mu\text{g mL}^{-1}$	100
TABELA 13: Comparação dos Valores de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre Complexos de Ag(I) e Antibióticos Padrão	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Organização dos envoltórios celulares bacterianos: comparação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	2
FIGURA 2: Núcleos estruturais de antibióticos β -lactâmicos: Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e os carbapenemes.	3
FIGURA 3: Carcinogênese: da célula normal à célula cancerosa.	6
FIGURA 4: Estimativa global de mortes por câncer em 2022 (~9,42 milhões) fonte dos dados: GLOBOCAN/OMS 2022.....	7
FIGURA 5: Modos de coordenação mais comuns para complexos de Ag(I).	11
FIGURA 6: Mecanismos de ação propostos para íons Ag^+ em células bacterianas e eucarióticas (fungos/protozoários/células tumorais).....	13
FIGURA 7: Complexos de prata com atividade antitumoral sintetizados.....	14
FIGURA 8: Estrutura química do complexo $[\text{Ag}(\text{SCN})(\text{PR}_3)_2]$ sintetizado.....	15
FIGURA 9: Estruturas químicas dos complexos do tipo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{L1-L3})](\text{NO}_3)$, sintetizados por Silva et al.....	16
FIGURA 10: Estrutura química do complexo $[\text{Ag}(\text{catsc})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ sintetizado por Khalaji e colaboradores.....	17
FIGURA 11: Estrutura geral de compostos tiossemicarbazonas e semicarbazonas.	20
FIGURA 12: Planejamento estrutural dos complexos de prata(I) desenvolvidos neste trabalho e contribuição de cada fragmento.	24

FIGURA 13: Estruturas químicas dos ligantes e pares doadores. As diiminas aromáticas derivadas da 1,10-fenantrolina atuam como quelantes $\kappa^2\text{N,N}$; a semicarbazona (SCZ) como $\kappa^2\text{N,O}$ (N imina e O carbonila) e a tiossemicarbazona (TSC) como $\kappa^2\text{N,S}$ (N imina e S tiona/tiolato). Os átomos doadores estão destacados em cores distintas.	27
FIGURA 14: Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.	35
FIGURA 15: Preparo de amostras por diluição seriada (1:2) para determinação quantitativa da atividade antimicrobiana.	40
FIGURA 16: Preparo das placas de inoculação para teste quantitativo de atividade antimicrobiana. CC: controle de coloração; CM: controle do meio de cultura; CN: controle negativo; CP: controle positivo; CN: controle negativo; CS: controle de surfactante (DMSO).	41
FIGURA 17: Mecanismo de reação proposto para a formação da tiossemicarbazona cinemaldeído TSC.	45
FIGURA 18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do ligante Semicarbazona em DMSO- d_6	46
FIGURA 19: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do ligante tiossemicarbazona em DMSO- d_6	48
FIGURA 20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) para os ligantes, a)phen, b) batophen e c)phendiona.	50
FIGURA 21: Espectro de absorção na região do UV-Vis das soluções dos complexos na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO em 0 h, 24 h e 48 h.	56

FIGURA 22: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	61
FIGURA 23: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	64
FIGURA 24: Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT-135 (100 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	66
FIGURA 25: Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	67
FIGURA 26: Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	69
FIGURA 27: Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	71
FIGURA 28: Espectro de ESI-MS do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$ (a) Experimental e (b) Teórico.	73
FIGURA 29: A) imagens representativas das colônias de MDA-MB-231 após 10 dias nas condições: controle DMSO; $1/4 \times \text{IC}_{50}$, $1/2 \times \text{IC}_{50}$ e $1 \times \text{IC}_{50}$ do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$. B) distribuição do número de colônias para cada concentração. A análise estatística foi realizada com one-way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett ($***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$).	82
FIGURA 30: Micrografias em campo claro de MDA-MB-231 tratadas com $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ nas concentrações $1 \times \text{IC}_{50}$, $2 \times \text{IC}_{50}$ e $4 \times \text{IC}_{50}$ por 0, 24 e 48 h. Colunas: Controle (DMSO), $1 \times$, $2 \times$ e $4 \times \text{IC}_{50}$. Linhas: 0 h, 24 h e 48 h. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.	85

FIGURA 31: Ensaio morfológico por fluorescência, células MDA-MB-231 tratadas com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ e marcadas com Green Plasma (verde) $\lambda_{exc} = 522 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ e DAPI (azul) $\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$. Condições: Controle (DMSO), 1×, 2× e 4× IC_{50} por 48 h. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S. 87

FIGURA 32: A) Crescimento dos esferoides para a linhagem celular MDA-MB-231 tratada com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ variando-se tempo e concentração e B) Gráficos dos diâmetros dos esferoides pelo tempo de tratamento. Imagens obtidas com microscópio CELENA® 90

FIGURA 33: Marcações dos esferoides com DAPI e PI da linhagem celular MDA-MB-231 tratada com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ após 144 horas. 92

FIGURA 34: Interação com o DNA via UV-Vis em concentração fixa do complexo e variações crescentes da concentração de ct-DNA..... 104

FIGURA 35: A) Gel de eletroforese onde no controle negativo: plasmídeo pUC19 + DMSO + TBE 1x (MIX). Controle positivo: cisplatina $[5,0 \times 10^{-6}M]^+$ (MIX) e nos outros poços variações das concentrações dos complexos + MIX. B) Conformações que o DNA pode assumir dependendo das interações. 107

FIGURA 36: Gel de eletroforese para as diferentes isoformas das enzimas topoisomerases na presença decrescente das concentrações dos complexos respectivamente. a) TOPOII α ; C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOII α + ATP. b) C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOII β +ATP. 110

RESUMO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE PRATA(I) COM LIGANTES QUELANTES DOADORES N,N, N,O E N,S: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.

Neste trabalho, foram sintetizados e caracterizados complexos de prata(I) contendo ligantes heterocíclicos das classes fenantrolina e (tio)semicarbazonas, com o objetivo de investigar suas propriedades antitumorais e antibacterianas. A síntese foi conduzida em meio homogêneo, com rendimentos satisfatórios (60 – 88%). A caracterização dos complexos incluiu técnicas como IV, UV-Vis, RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar (CHN) e espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QTOF-MS). Os ensaios de citotoxicidade revelaram que os complexos apresentaram atividade significativa frente às linhagens tumorais A2780, MDA-MB-231 e A549, com valores de IC_{50} entre 0,18 e 7,2 μM . Os compostos demonstraram seletividade em relação à linhagem não tumoral MRC-5, com índices de seletividade (IS) superiores a 5, especialmente o complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$. Além disso, foi observada uma capacidade inibitória específica sobre a atividade da topoisomerase $\text{II}\alpha$, sem interferência na isoforma $\text{II}\beta$, sugerindo uma seletividade enzimática potencialmente benéfica. Ensaio realizados com o plasmídeo pUC19 não indicaram clivagem significativa do DNA nas concentrações avaliadas. Nos testes microbiológicos, os complexos demonstraram atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*). O complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ se destacou, apresentando valores de CIM entre 1,95 e 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A maior suscetibilidade observada nas bactérias Gram-positivas pode ser atribuída à ausência da membrana externa lipopolissacarídica, o que facilitaria o acesso dos complexos aos alvos intracelulares. Quanto à atividade anti-*Leishmania* (promastigotas), os complexos contendo

phendiona ou batophen exibiram EC_{50} submicromolar: 0,2 – 0,5 μM para *L. amazonensis* e 0,3 – 0,5 μM para *L. braziliensis*, com citotoxicidade em RAW 264.7 na faixa 1,6 – 3,8 μM , resultando em índices de seletividade (IS) frequentemente > 8 (até ~12,7, conforme o sistema). Em conjunto, os resultados apontam complexos de Ag(I) com ligantes N,O/N,S como candidatos multifuncionais com potência e seletividade relevantes, interação dirigida com alvos biomoleculares (topo II α) e amplo espectro de ação (tumores, bactérias e *Leishmania*), justificando estudos mecanísticos e avaliação *in vivo*.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER(I) COMPLEXES WITH N,N, N,O AND N,S DONOR CHELATING LIGANDS: EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY:

In this work, silver(I) complexes containing heterocyclic ligands from the phenanthroline and (thio)semicarbazone classes were synthesized and characterized to investigate their antitumor and antibacterial properties. The synthesis was carried out homogeneous conditions, yielding products with good yields (60–88%). The complexes were characterized by techniques including infrared spectroscopy (IR), UV-Vis spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR, elemental analysis (CHN), and high-resolution mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS). Cytotoxicity assays revealed significant activity of the complexes against tumor cell lines A2780, MDA-MB-231 and A549, with IC_{50} values ranging from 0.18 to 7.2 μM . Several complexes exhibited selectivity over the non-tumor cell line MRC-5, with selectivity indices (SI) greater than 5, particularly the $[\text{Ag}(\text{phendione})(\text{scz})]^+$ complex. Additionally, the complexes showed selective inhibitory activity against topoisomerase $\text{II}\alpha$, without affecting the $\text{II}\beta$ isoform, indicating potentially beneficial enzymatic selectivity. Assays performed with the pUC19 plasmid showed no significant DNA cleavage at the tested concentrations. Microbiological tests demonstrated antibacterial activity against Gram-positive strains (*S. aureus*, *S. epidermidis*) and Gram-negative strains (*E. coli*, *K. pneumoniae*). The $[\text{Ag}(\text{phendione})(\text{scz})]^+$ complex stood out with minimum inhibitory concentrations (MIC) ranging from 1.95 to 15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The greater susceptibility observed in Gram-positive bacteria may be attributed to the absence of the lipopolysaccharide outer membrane, facilitating access of the complexes to intracellular targets. Regarding anti-*Leishmania* activity (promastigotes), complexes containing phendione or batophen exhibited

submicromolar EC₅₀ values: 0.2–0.5 μ M for *L. amazonensis* and 0.3 – 0.5 μ M for *L. braziliensis*, with cytotoxicity in RAW 264.7 within 1.6 – 3.8 μ M, resulting in selectivity indices (SI) frequently > 8 (up to ~12.7, depending on the system). Taken together, the results identify Ag(I) complexes with N,O/N,S-donor ligands as multifunctional candidates with relevant potency and selectivity, directed interaction with biomolecular targets (topo II α), and broad activity spectrum (tumors, bacteria, and *Leishmania*), thereby justifying mechanistic studies and *in vivo* evaluation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Bactérias e a resistência bacteriana	1
1.2 O Câncer: Definição, panorama e fatores de risco.....	5
1.3 Leishmaniose.....	8
1.4 Prata como metalofármaco: usos médicos e aplicações biológicas de seus complexos metálicos	10
1.5 Planejamento dos complexos de prata (I)	19
1.6 Planejamento estrutural e proposta de desenho molecular	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Solventes e Reagentes	26
3.2 Síntese dos ligantes	27
3.2.1 Síntese dos ligantes Semicarbazona e Tiosemicarbazona	27
3.2.2 Síntese do ligante 1,10-fenantrolina-5,6-diona	28
3.3 Síntese dos complexos de Ag(I).....	29

3.3.1 Síntese dos complexos de Ag(I) com 1,10-fenantrolina.....	29
3.3.2 Síntese dos complexos de Ag(I) com 1,10-fenantrolina-5,6-diona	30
3.3.3 Síntese dos complexos de Ag(I) com 4,7-difenil-1,10-fenantrolina.....	30
3.4 Equipamentos e Metodologia.....	31
3.4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	31
3.4.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis	31
3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
3.4.4 Análise Elementar	32
3.4.5 Medidas de condutividade molar	32
3.4.6 Espectrometria de massas de alta resolução UHPLC-QTOF-MS	32
3.4.7 Linhagens celulares	34
3.4.8 Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT).....	35
3.4.9 Ensaio de Eficiência Clonogênica.....	36
3.4.10 Ensaio de Morfologia celular campo claro	36
3.4.11 Ensaio de morfologia celular por fluorescência (Green plasma/DAPI)	36
3.4.12 Ensaio de cultura celular 3D	37
3.4.13 Ensaio de Atividade Anti-Leishmania	38
3.4.14 Inibição Bacteriana.....	39

3.4.15 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	40
3.4.16 Interação com o ct-DNA via espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis).....	41
3.4.17 Interação com plasmídeo superenovelado (pUC19) via eletroforese	42
3.4.18 Inibição TOPO II α e II β via eletroforese	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Síntese e caracterização dos ligantes.....	44
4.2 Síntese e caracterização dos complexos.....	52
4.3 Estabilidade em solução dos complexos	54
4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos complexos	59
4.4.1 Caracterização do complexo [Ag(phendiona)(scz)] ⁺	61
4.5 Caracterização por espectrometria de massas	72
4.6 Ensaio com linhagens celulares: Viabilidade celular (IC ₅₀)	75
4.7 Avaliação da atividade antiproliferativa e efeitos morfológicos em células tumorais	81
4.7.1 Ensaio clonogênico: impacto do complexo na sobrevivência a longo prazo ..	81
4.7.2 Análise morfológica celular: alterações morfológicas em curto prazo.....	84
4.8 Avaliação da Atividade Antitumoral em Modelo 3D (Esferoides Tumorais) ...	89
4.9 Atividade Anti-Leishmania	94

4.10 Atividade antibacteriana.....	97
4.10.1 Atividade qualitativa	97
4.10.2 Atividade quantitativa	100
4.11 Interação com DNA: titulação espectroscópica com <i>ct</i> -DNA	104
4.12 Interação com DNA: interação com plasmídeo superenovelado	106
4.13 Ensaio de inibição da enzima Topoisomerase II α e II β via eletroforese	108
5. CONCLUSÃO.....	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
7. APÊNDICE	124

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias e a resistência bacteriana

As bactérias são microrganismos unicelulares amplamente distribuídos em ambientes diversos, incluindo solo, água, alimentos e organismos vivos. Elas desempenham papéis essenciais nos ciclos biogeoquímicos e na manutenção de ecossistemas, sendo também componentes naturais da microbiota humana. No entanto, algumas espécies bacterianas são patogênicas e podem causar doenças em humanos e animais. Ao longo da história, infecções bacterianas representaram importantes causas de mortalidade, até que a introdução dos antibióticos no século XX revolucionou a medicina, proporcionando tratamentos eficazes e salvando milhões de vidas¹⁻³.

As bactérias patogênicas são geralmente classificadas em dois grandes grupos com base na coloração de Gram: Gram-positivas e Gram-negativas. Essa diferenciação, proposta por Hans Christian Gram em 1884, baseia-se na estrutura da parede celular bacteriana. No método, após a fixação do esfregaço, aplicam-se cristal violeta e iodo (formando o complexo cristal violeta-iodo), segue-se a descoloração com etanol/acetona e a contracoloração com safranina; a retenção ou perda do complexo cristal violeta-iodo revela o tipo de envoltória. As Gram-positivas possuem parede espessa de peptidoglicano, o que retém o corante e resulta em coloração roxa (ex.: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*). As Gram-negativas exibem peptidoglicano fino no periplasma e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeo (LPS), que permite a saída do corante na etapa de descoloração e leva à coloração rosada pela safranina (ex.: *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae). Essa diferenciação é crucial, pois orienta a escolha do antibiótico: a presença de membrana externa e porinas nas Gram-negativas reduz a permeabilidade a vários fármacos, enquanto as Gram-positivas, em geral, são mais acessíveis a β -lactâmicos e glicopeptídeos (ressalvados mecanismos de resistência)⁴⁻⁷.

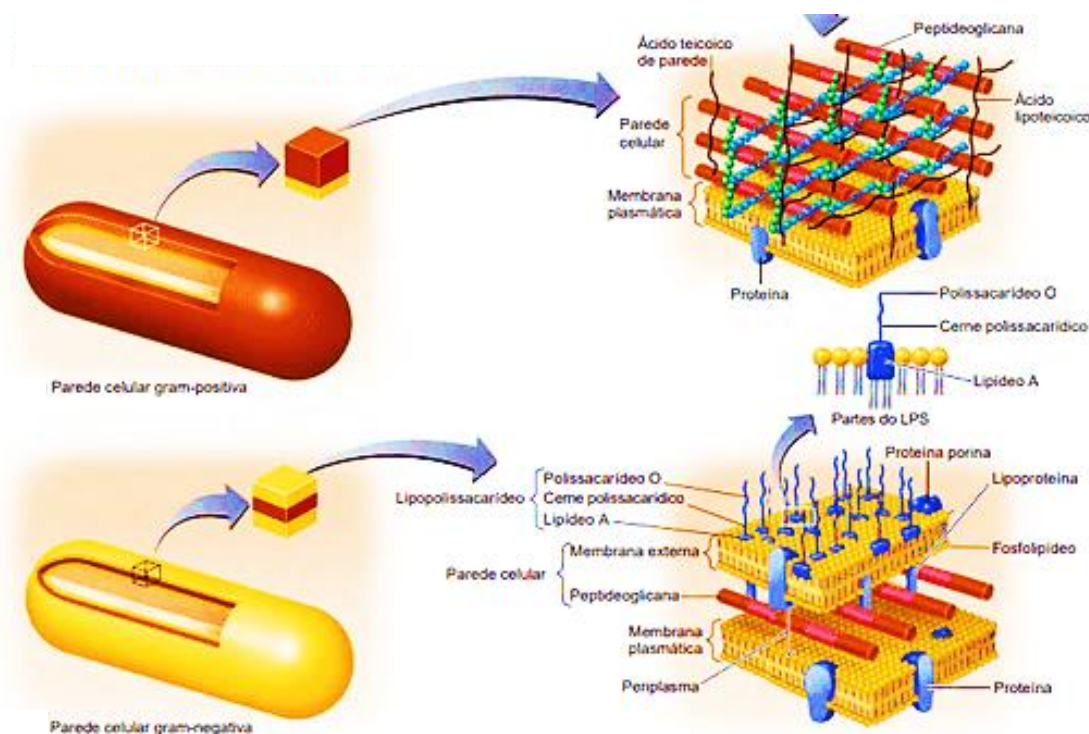


FIGURA 1: Organização dos envoltórios celulares bacterianos: comparação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas⁸.

Antibióticos são fármacos que inibem o crescimento bacteriano (bacteriostáticos) ou promovem a morte celular (bactericidas) e costumam ser organizados pelo alvo molecular: (i) síntese da parede celular (β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos; além de glicopeptídeos), (ii) síntese proteica no ribossomo (aminoglicosídeos e tetraciclina — subunidade 30S; macrolídeos, lincosamidas e oxazolidinonas — subunidade 50S), (iii) replicação e reparo do DNA (quinolonas/fluoroquinolonas que atuam em DNA girase e topoisomerase IV),

(iv) metabolismo do folato (sulfonamidas/trimetoprim) e (v) integridade da membrana (polimixinas). Entre essas classes, os β -lactâmicos compartilham o farmacóforo anel β -lactâmico de quatro membros, que mimetiza o dipeptídeo D-Ala–D-Ala e forma um intermediário covalente com as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs/transpeptidases), bloqueando a reticulação do peptidoglicano; o enfraquecimento da parede aciona autolisinas e culmina em lise osmótica. Diferenças no esqueleto central (tiazolidínico nas penicilinas, diidrotiazinínico nas cefalosporinas, anel único nos monobactâmicos e núcleo carbapenêmico com maior tensão) e nas cadeias laterais modulam espectro de ação (Gram⁺/Gram⁻), estabilidade a β -lactamases e propriedades farmacocinéticas; combinações com inibidores de β -lactamase ampliam a cobertura frente a mecanismos de resistência. A FIGURA 2 apresenta os núcleos estruturais dessas subclasses, destacando o anel β -lactâmico, elemento chave para a atividade.⁹⁻¹¹

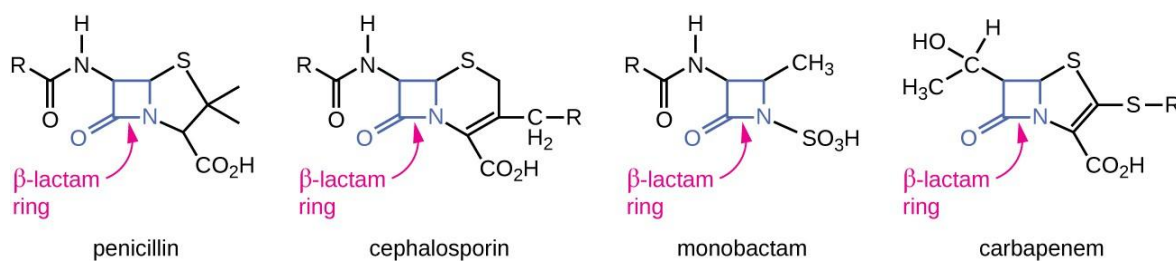


FIGURA 2: Núcleos estruturais de antibióticos β -lactâmicos: Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e os carbapenemes¹¹.

No Brasil, o uso de antibióticos aumentou significativamente. Dados da plataforma epharma indicam que, entre janeiro e abril de 2023, houve um aumento de 108% nas unidades vendidas de antibióticos em comparação ao mesmo período de 2022 . Esse crescimento acende um alerta sobre o uso

indiscriminado e a automedicação, fatores que contribuem para o desenvolvimento de resistência bacteriana¹².

O uso extensivo e muitas vezes inadequado desses agentes antimicrobianos gerou uma pressão seletiva intensa sobre as populações bacterianas, favorecendo o surgimento e a disseminação de cepas resistentes. A resistência bacteriana ocorre quando os microrganismos desenvolvem mecanismos para neutralizar ou evadir a ação dos antibióticos, como a modificação do alvo molecular, a produção de enzimas inativadoras (como as β -lactamases), o aumento da efluxão do fármaco ou a redução da permeabilidade da membrana celular^{12,13}.

Nos últimos anos, a resistência antimicrobiana tornou-se uma crise global de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) alertou, em seu relatório de 2019, que infecções causadas por bactérias resistentes já são responsáveis por centenas de milhares de mortes anuais, com projeções indicando que, até 2050, esse número poderá ultrapassar 10 milhões, superando o número de mortes por câncer. Casos como os de infecções hospitalares por *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, ou a disseminação de cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), evidenciam a gravidade da situação¹¹⁻¹⁵.

Além disso, a pandemia de COVID-19 acentuou o problema, com o aumento do uso de antibióticos mesmo em casos de infecção viral, contribuindo ainda mais para o avanço da resistência. Diversos estudos têm apontado que mais de 70% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 receberam antibióticos, embora apenas uma fração tivesse coinfeção bacteriana comprovada¹²⁻¹⁵.

Diante desse panorama alarmante, torna-se fundamental buscar novas abordagens terapêuticas que superem os mecanismos tradicionais de resistência bacteriana. Nesse contexto, os complexos metálicos surgem como uma alternativa promissora, apresentando mecanismos de ação multifacetados e capacidade de interferir em múltiplos alvos celulares bacterianos. A complexação de íons metálicos com ligantes orgânicos apropriados permite modular características importantes como solubilidade, estabilidade e seletividade, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes no combate a infecções resistentes¹⁵⁻²¹.

1.2 O Câncer: Definição, panorama e fatores de risco

O câncer é um conjunto heterogêneo de mais de 100 doenças que compartilham a capacidade de proliferação descontrolada, invasão de tecidos vizinhos e, em estágios avançados, disseminação metastática por via sanguínea ou linfática. Sua origem é multifatorial, envolvendo o acúmulo de mutações somáticas e alterações epigenéticas sob a influência de agentes carcinogênicos químicos, físicos e biológicos, inflamação crônica e falhas nos sistemas de reparo do DNA e controle do ciclo celular. Apesar de características comuns, como sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa (ativação de telomerase), angiogênese, invasão/metástase, reprogramação metabólica e evasão imune, cada tipo tumoral exhibe assinaturas moleculares e genéticas próprias, que determinam comportamento clínico, prognóstico e estratégias

terapêuticas²². A FIGURA 3 ilustra esse percurso, do estado normal da célula ao canceroso.

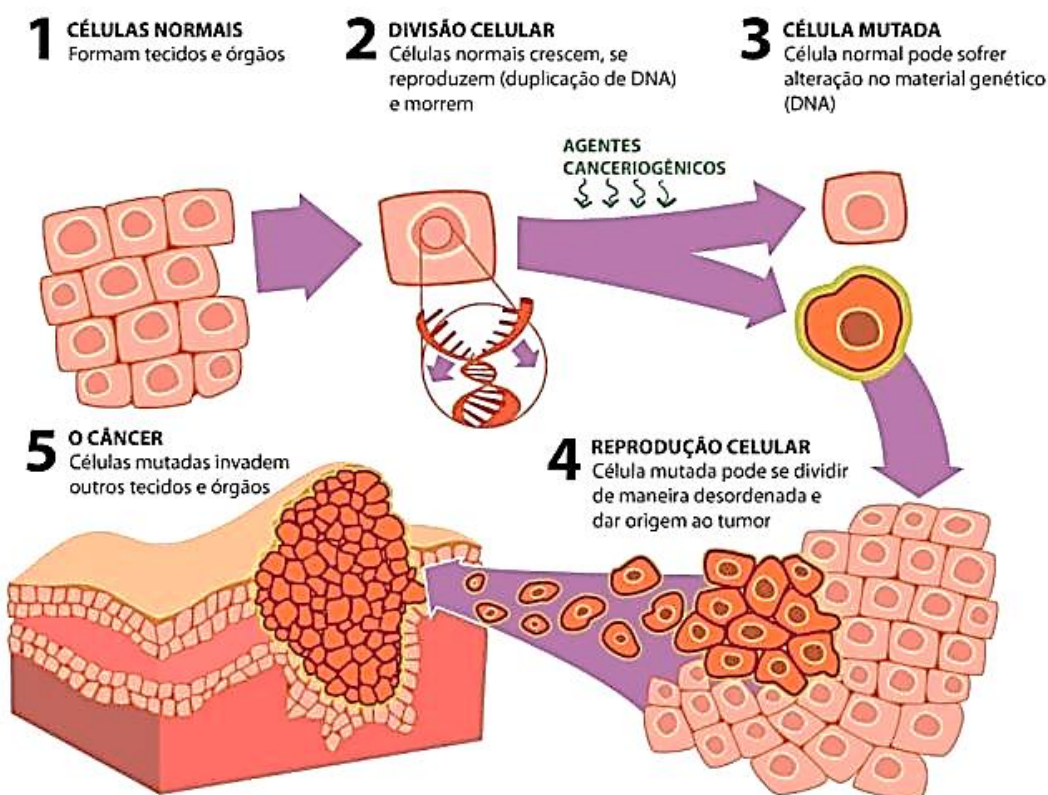


FIGURA 3: Carcinogênese: da célula normal à célula cancerosa²².

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer foi responsável por cerca de 10 milhões de mortes em 2020, o que o posiciona entre as principais causas de óbito no mundo. Os tipos mais prevalentes incluem câncer de pulmão, mama, colorretal, próstata e estômago (FIGURA 4). Projeções indicam que o número de novos casos poderá atingir 28,4 milhões até 2040, representando um aumento de 47 % em relação a 2020. No Brasil, o

Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima aproximadamente 704 mil novos casos para o triênio 2023-2025²²⁻²³.

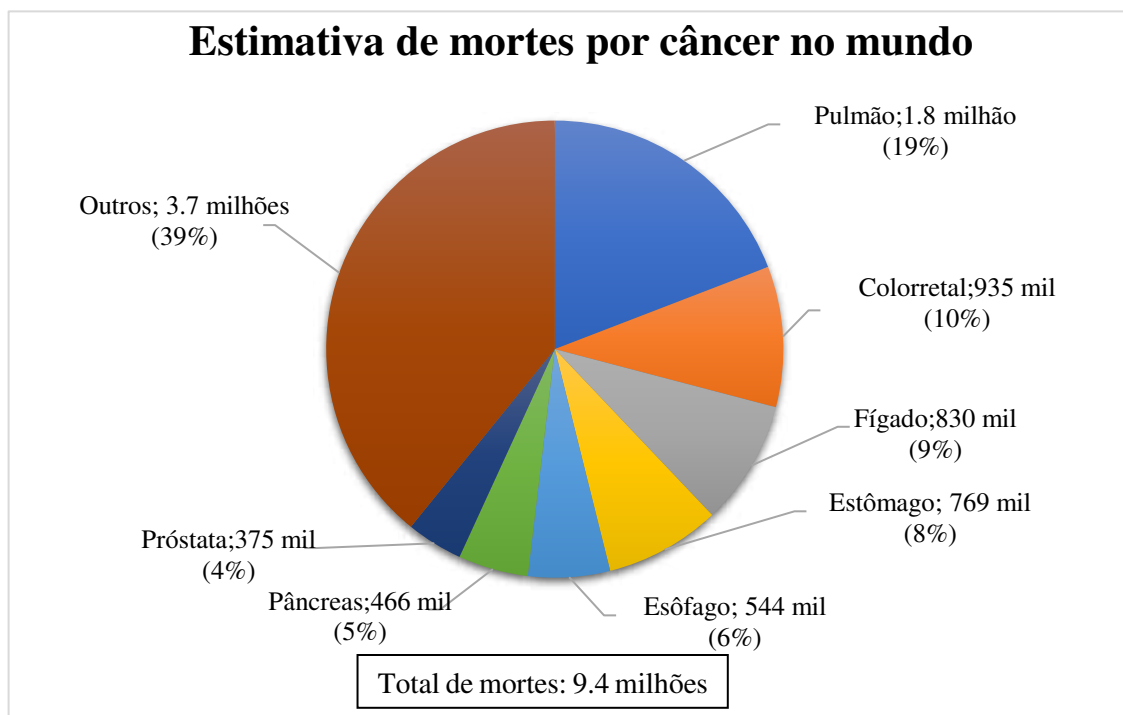


FIGURA 4: Estimativa global de mortes por câncer em 2022 (~9,42 milhões) fonte dos dados: GLOBOCAN/OMS 2022²³.

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da doença, incluindo: predisposição genética, envelhecimento, exposição a agentes carcinogênicos (como tabaco, radiação, poluentes e produtos químicos), infecções crônicas (como as causadas por HPV, H. pylori ou hepatites virais), estilo de vida sedentário, dieta inadequada e obesidade. A compreensão desses fatores tem sido essencial para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas²¹⁻²⁷.

Os tratamentos convencionais incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia, terapias alvo-dirigidas e terapia fotodinâmica. A escolha depende do tipo e estágio da doença, além das

condições clínicas do paciente. Entre os agentes quimioterápicos mais relevantes estão os complexos metálicos, sendo a cisplatina (*cis*-[PtCl₂(NH₃)]) o exemplo mais notável^{27,28}.

A descoberta da cisplatina como agente antitumoral remonta ao final da década de 1960, quando Barnett Rosenberg, ao investigar os efeitos da corrente elétrica sobre o crescimento de *Escherichia coli*, observou que compostos de platina inibiam a divisão celular. Esses achados culminaram na identificação da cisplatina como uma molécula com potente atividade antineoplásica. Após extensivos testes pré-clínicos e clínicos, o composto foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos em 1978 para o tratamento de câncer de testículo, bexiga e ovário, marcando o início de uma nova era na quimioterapia baseada em metais.

Desde então, a pesquisa em fármacos inorgânicos tem se expandido significativamente, com a exploração de diversos metais e estruturas coordenadas visando melhorar a seletividade, reduzir efeitos adversos e superar a resistência adquirida aos tratamentos convencionais. A versatilidade estrutural dos complexos metálicos permite o desenvolvimento de agentes multitarget, capazes de interagir com DNA, proteínas e organelas celulares, oferecendo um vasto campo de possibilidades para o tratamento de câncer e outras doenças crônicas²⁸⁻³⁰.

1.3 Leishmaniose

A leishmaniose reúne doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos. Clinicamente, manifesta-se sobretudo nas formas cutânea (LC), mucosa (LM) e visceral (LV, kala-azar), variando de lesões cutâneas autolimitadas a quadros sistêmicos potencialmente

fatais. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas; ocorrem anualmente 1 milhão de casos de LC e aproximadamente 30–90 mil casos de LV, com subnotificação relevante. A LV, se não tratada, é fatal em 95% dos casos e ocorre majoritariamente no Brasil, na África Oriental e na Índia^{23,24}.

O ciclo de vida envolve promastigotas no inseto vetor e amastigotas intracelulares em macrófagos do hospedeiro vertebrado. Nas Américas, *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie mais disseminada e associada a LC, LM e formas disseminadas; no Brasil, além de *L. braziliensis*, há participação de outras espécies em LC e *L. infantum* na LV (com cães como reservatórios urbanos). O principal vetor da LV no país é *Lutzomyia longipalpis*, cuja adaptação ao ambiente urbano contribuiu para a expansão/urbanização da doença^{23,25}.

O diagnóstico integra avaliação clínica e epidemiológica com métodos laboratoriais: parasitológicos (exame direto/cultura), moleculares (PCR/tipagem) e sorológicos (mais úteis na LV). A identificação da espécie é recomendada quando viável, por impacto terapêutico e prognóstico²⁶.

O tratamento inclui antimoniais pentavalentes, anfotericina B (deoxicolato e formulações lipossomais), miltefosina (uso oral em indicações específicas), além de pentamidina e paromomicina (tópica/sistêmica conforme protocolo). Apesar da eficácia, persistem toxicidades, regimes prolongados e falhas/recidivas em cenários particulares. No caso da miltefosina, destacam-se eventos adversos gastrointestinais e hepatobiliares e teratogenicidade, exigindo vigilância e elegibilidade criteriosa conforme diretrizes^{25,26}.

Nas Américas (2001–2023) foram notificados 1.178.436 casos de LC/LM (média 51.236/ano) e 73.092 de LV (média 3.178/ano), com letalidade de 8% para LV— a mais alta entre os continentes. No Brasil, a LC mantém média de 21 mil casos/ano (incidência 8,6/100 mil nos últimos cinco anos), com maior carga na Região Norte; a LV apresenta surtos localizados, principalmente no Norte e Nordeste, com ocorrência crescente em contextos urbanos/periurbanos²⁴.

As limitações do arsenal atual (toxicidade, vias parenterais, recidiva, acesso) e o risco de resistência sustentam a busca por novas entidades químicas. Entre elas, complexos metálicos e metalofármacos se destacam por potenciais mecanismos multimodais (interação com alvos contendo tióis, estresse oxidativo, perturbação mitocondrial, interação com DNA/enzimas) e possibilidade de otimização fisicoquímica via desenho de ligantes²⁶.

1.4 Prata como metalofármaco: usos médicos e aplicações biológicas de seus complexos metálicos

A prata encontra-se entre os três primeiros metais descobertos pelo Homem, juntamente com o ouro e o cobre sendo conhecidos também como “metais de cunhagem”, tendo seus primeiros indícios datados de aproximadamente 4000 a.C. e sua primeira utilização como moeda em 700 a.C. na Ásia. Possui a configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^1$, peso atômico de 107,86 g mol⁻¹ e uma abundância isotópica de aproximadamente 1:1 entre os isótopos de massa ^{107}Ag e ^{109}Ag .

O estado de oxidação mais relevante é +1 (Ag^+), com configuração $[\text{Kr}] 4d^{10}$. Íons Ag^+ formam ampla variedade de complexos; com ligantes simples, é frequente número de coordenação 2 e geometria linear, como em

$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ e $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$. Também ocorrem espécies com coordenação 3 (trigonal plana) e 4 (tetraédrica); em condições específicas e com ligantes multidentados/ponte, podem surgir complexos de coordenação 5 (trigonal bipiramidal) ou 6 (octaédrica), embora estes sejam menos comuns para $\text{Ag}(\text{I})$. Os modos de coordenação mais frequentes estão esquematizados na FIGURA 5.²⁸⁻³¹

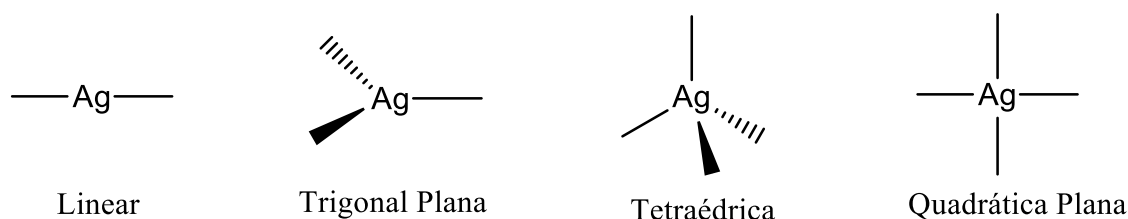


FIGURA 5: Modos de coordenação mais comuns para complexos de $\text{Ag}(\text{I})$.

Os compostos de prata, são muito interessantes no campo da medicina, pois combinam o uso tradicional desse metal como medicamento para muitas doenças com a relativa “novidade” de metalofármacos, que se popularizou com a introdução da cisplatina como um poderoso agente quimioterápico há cerca de 50 anos. Recentemente, os complexos de prata também demonstraram possuir propriedades anticancerígenas, abrindo uma nova perspectiva para a química de coordenação no combate a doenças³⁰⁻³³.

Até a descoberta e invenção dos antibióticos, a prata era uma das poucas drogas capazes de curar infecções, queimaduras e feridas e prevenir doenças contagiosas. A introdução dos antibióticos (por volta de 1940) diminuiu drasticamente o uso da prata na medicina, embora continuasse a ser empregada no tratamento de queimaduras na forma de sulfadiazina de prata ou coloides de prata, em curativos e pomadas³²⁻³⁵.

Porém, desde a década de 1990, estudos envolvendo sua aplicabilidade na medicina vêm sendo desenvolvidos, principalmente em sua forma metálica como suspensões coloidais³²⁻³⁶. A toxicidade da prata para células bacterianas tem sido reconhecida e documentada há muito tempo, enquanto para os humanos sua toxicidade parece ser bastante baixa: este metal não tem função biológica, mas foi encontrado em tecidos humanos como consequência da bioacumulação ao longo da vida, com uma concentração média de alguns microgramas por quilo de tecido úmido, indicando que o organismo pode tolerar a presença de prata em baixas doses sem quaisquer efeitos tóxicos, provavelmente pela formação de AgCl. Assim, a baixa toxicidade é uma das maiores vantagens da prata sobre outros metais medicinalmente relevantes e o poder antimicrobiano de seus compostos iônicos podem ser explorados na prática médica com razoável segurança³⁶⁻⁴².

Os mecanismos pelos quais a prata exerce efeitos tóxicos contra bactérias, fungos, protozoários e células cancerígenas são complexos e vêm sendo elucidados mais recentemente. Eles dependem do tipo de composto (sal, complexo, nanopartícula) e do alvo celular. Em comum, a espécie biologicamente ativa é a forma catiônica Ag^+ , liberada in situ a partir desses materiais.³⁶⁻³⁹.

Os principais mecanismos citotóxicos atribuídos a Ag^+ estão resumidos na FIGURA 6⁴²⁻⁴⁸.

i) O íon Ag^+ pode se coordenar a grupos tióis de proteínas e enzimas encontradas na superfície da parede celular, levando a desestabilização da membrana celular e bloqueio dos processos de síntese de ATP;

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

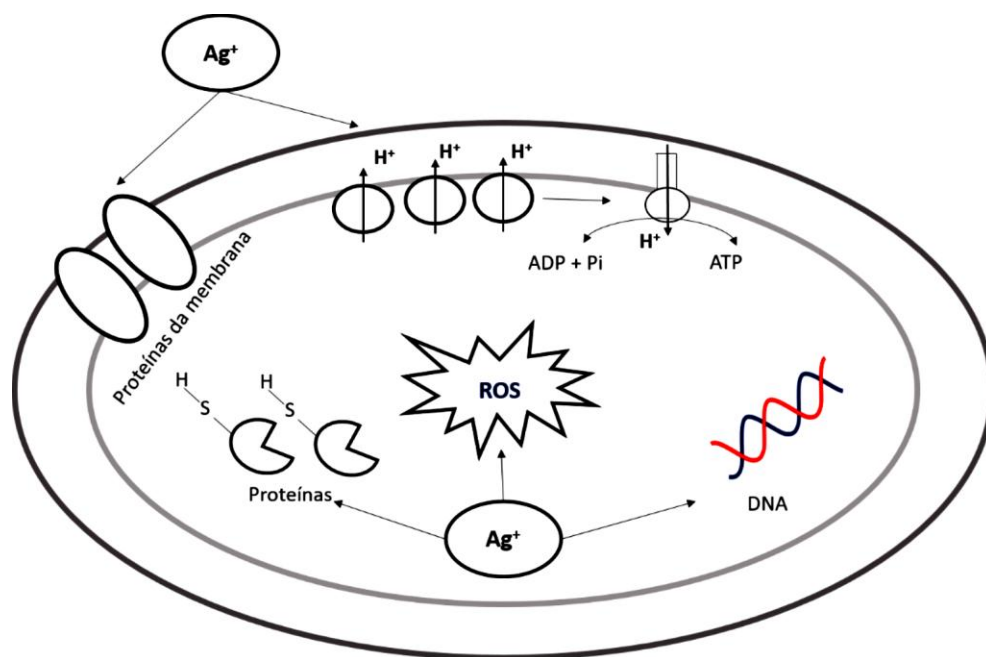
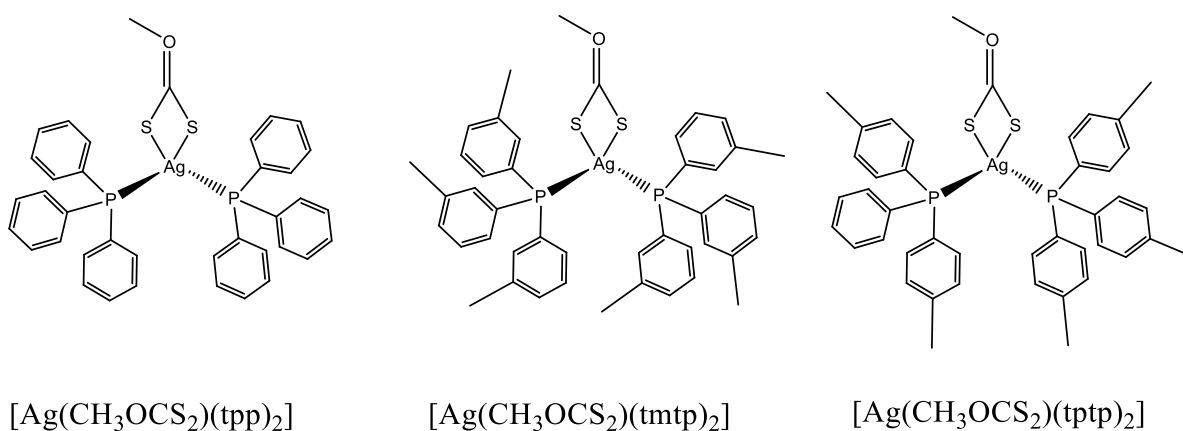


FIGURA 6: Mecanismos de ação propostos para íons Ag^+ em células bacterianas e eucarióticas (fungos/protozoários/células tumorais)⁴².

Diversos trabalhos reportados na literatura demonstram o potencial farmacológico de complexos de prata na inibição de linhagens de células tumorais. Neste contexto foi investigada a atividade antitumoral de complexos

de prata com ligante metil-xantato e trifenilfosfinas (FIGURA 7)⁴⁹. 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 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que foram em sua maioria menores do que os valores do fármaco padrão, cisplatina (5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Isso mostra que esses complexos possuem grande potencial inibitório para essa linhagem. Enquanto para a linhagem MDA-MB-231 não apresentaram atividade⁴⁹.



*tpp = trifenilfosfina; tptp = tri(p-toluil) fosfina; tmtpp = tri(m-toluil) fosfina.

FIGURA 7: Complexos de prata com atividade antitumoral sintetizados⁴⁹.

Em outro estudo, foi investigado o potencial antitumoral do complexo de prata $[\text{Ag}(\text{SCN})(\text{PR}_3)_2]$ (PR_3 = tris-4-metóxfenilfosfina), FIGURA 8, contra a linhagem tumoral de esôfago SNO. Este complexo proposto demonstrou ser 12 vezes mais poderoso do que a cisplatina contra as células SNO (cisplatina IC₅₀ = $42,89 \pm 5,04 \mu\text{M}$ e $[\text{Ag}(\text{SCN})(\text{PR}_3)_2]$ IC₅₀ = $3,5 \pm 0,91 \mu\text{M}$), além de apresentar uma menor citotoxicidade em células não

tumorais HDF-a (derme) e HEK-293 (rim). O complexo induz a apoptose das células tumorais que foi evidenciado pelo baixo nível de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), despolarização do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c e clivagem de caspase-9⁵⁰.

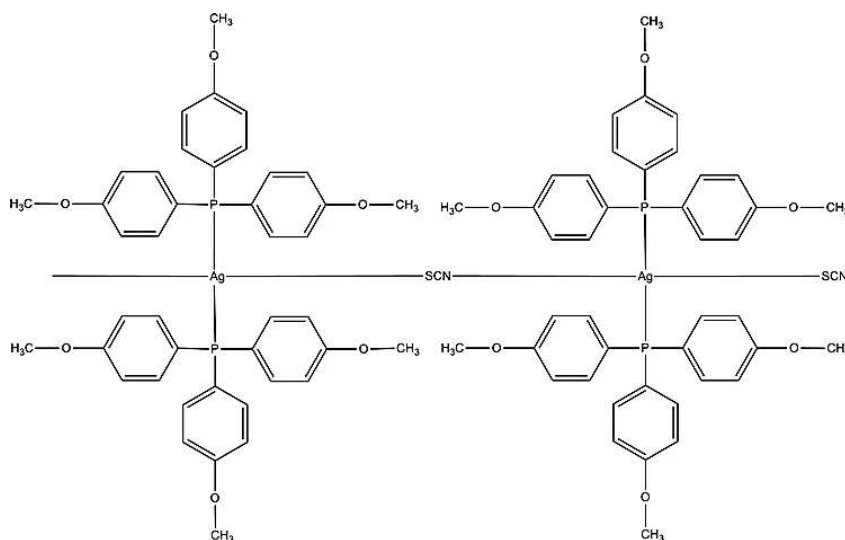


FIGURA 8: Estrutura química do complexo $[Ag(SCN)(PR_3)_2]$ sintetizado⁵⁰.

No trabalho desenvolvido por Silva e colaboradores⁵¹, realizou-se a síntese e caracterização de novos complexos de prata(I) contendo tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina e 1,10-fenantrolina (FIGURA 9). Neste estudo os compostos demonstraram atividade antiproliferativa significativa contra células tumorais humanas de pulmão (A549) e mama (MDA-MB-231 e MCF-7), com valores de IC₅₀ variando de 1,49 a 20,90 μ M. Além disso, apresentaram menor toxicidade em células não tumorais (MCF-10A). Estudos indicaram que os complexos induzem apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e perda do potencial de membrana mitocondrial. Ensaio de morte celular nas células MDA-MB-231 foram

realizados com o composto com o objetivo de avaliar seus efeitos na morfologia celular, indução de apoptose, ciclo celular, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). O composto causou alterações morfológicas, como encolhimento e arredondamento das células, aumentou a população da fase sub-G1 e induziu a morte celular apoptótica, a formação de ROS e a perda do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Os resultados de ligação ao DNA revelaram que o composto interagiu com o sulco menor do ct-DNA.

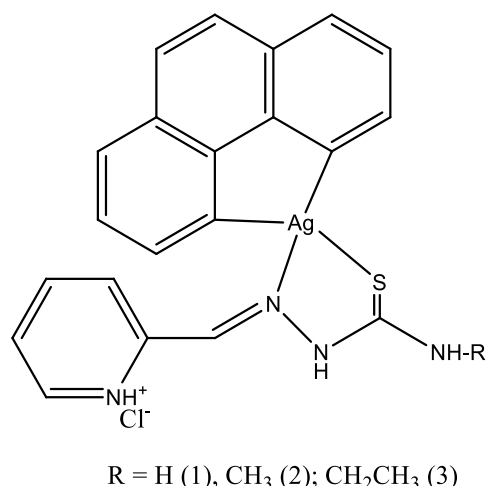


FIGURA 9: Estruturas químicas dos complexos do tipo [Ag(phen)(L1-L3)](NO₃), sintetizados por Silva et al⁵¹.

Em um outro estudo⁵², foi sintetizado um complexo de prata(I) com fórmula geral [Ag(L)(PPh₃)₂](NO₃)₂, em que L corresponde à 2-acetilpiridina-N(4)-metil-3-tiossemicarbazona e PPh₃ à trifenilfosfina. A avaliação da atividade antitumoral in vitro foi realizada utilizando as linhagens celulares BRL-3A (fibroblasto hepático normal) e Hepa1-6 (carcinoma hepatocelular murino), revelando citotoxicidade seletiva, com valores de IC₅₀ inferiores a 2

μM . Esses resultados indicam um potencial promissor do complexo na inibição seletiva de células tumorais hepáticas, com baixa toxicidade às células normais.

O estudo também investigou o mecanismo de ação do composto, demonstrando que sua atividade está associada à despolarização do potencial da membrana mitocondrial e ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses efeitos mitocondriais sugerem que o complexo atua induzindo estresse oxidativo e promovendo a apoptose celular, mecanismos frequentemente explorados por compostos antitumorais modernos. Assim, os dados destacam não apenas a potência citotóxica do complexo, mas também sua atuação seletiva e mecanismo de ação coerente com a proposta de desenvolvimento de agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos⁵².

Um estudo conduzido por Khalaji e colaboradores²¹ avaliou a atividade antibacteriana do complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{catsc})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ (FIGURA 10) contra cepas padrão de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

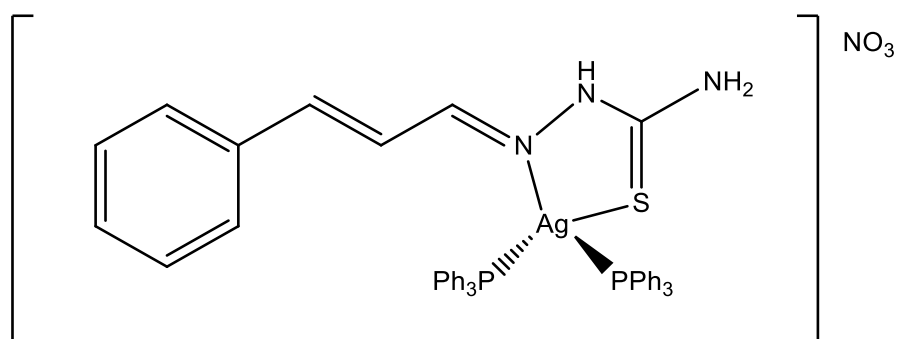


FIGURA 10: Estrutura química do complexo $[\text{Ag}(\text{catsc})(\text{PPh}_3)_2]\text{NO}_3$ sintetizado por Khalaji e colaboradores²¹.

TABELA 1: Valores de CIM para o ligante livre (catsc) e o complexo [Ag(catsc)(PPh₃)₂]₂NO₃.

Espécies de bactérias	MIC do complexo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC do ligante catsc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>E. faecalis</i> (ATCC29212)	60	>500
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	<1	>500
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	<1	>500
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC2753)	>500	>500

Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que o ligante livre não exibiu atividade antibacteriana contra nenhuma das cepas testadas, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) superiores a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em contraste, o complexo demonstrou atividade significativa frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, destacando-se pelos baixos valores de CIM inferiores a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *S. aureus* e *E. coli*.

Almeida e colaboradores⁵³ investigaram a citotoxicidade e a atividade antibacteriana de complexos de prata(I) contendo semicarbazonas e trifetilfosfina. Os compostos demonstraram expressiva atividade citotóxica frente às linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7, com valores de IC₅₀ variando de 1,68 a 8,40 μM (MDA-MB-231) e de 2,4 a 3,8 μM (MCF-7), superando significativamente a cisplatina, cujos valores foram de 67 μM e 20 μM , respectivamente. Em alguns casos, os complexos mostraram-se até 16 vezes mais ativos do que o fármaco padrão. Além disso, apresentaram atividade antibacteriana relevante contra cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*

ATCC 14458 e *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813) e Gram-negativa (*Salmonella typhi* ATCC 6539), com inibição do crescimento bacteriano variando entre 61 % e 85 %. Esses achados evidenciam o potencial promissor dos complexos de prata(I) para aplicações terapêuticas tanto no tratamento de câncer quanto de infecções bacterianas.

1.5 Planejamento dos complexos de prata (I)

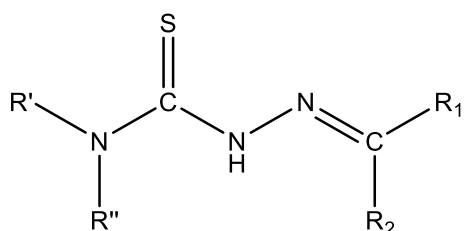
Em geral, o íon Ag(I) de configuração eletrônica $[Kr]4d^{10}$, forma complexos cineticamente lábeis, porém a labilidade de um complexo não depende exclusivamente da natureza do íon metálico, mas do conjunto metal-ligante. Nesse sentido, a escolha estratégica dos ligantes é essencial para controlar a estabilidade, reatividade e, conseqüentemente, as propriedades biológicas dos complexos de prata^{54,55}.

Do ponto de vista da teoria ácido-base dura e mole de Pearson (HSAB), o íon Ag(I) é classificado como um ácido mole, tendo, portanto, maior afinidade por ligantes com átomos doadores macios ou intermediários, como enxofre (S), fósforo (P), nitrogênio (N) e carbono (C). Dessa forma, a utilização de ligantes contendo esses elementos tende a favorecer a formação de complexos mais estáveis e menos susceptíveis à dissociação em meio biológico, o que é desejável para o desenvolvimento de metalo-fármacos⁵⁴⁻⁵⁶.

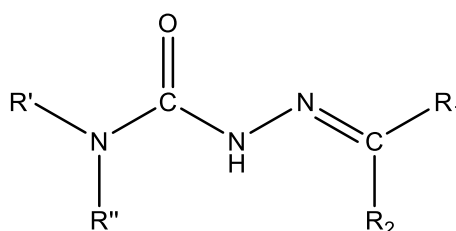
A coordenação de ligantes quelantes é uma estratégia bem conhecida para modular as propriedades físico-químicas de complexos de Ag(I), assim como incorporar ligantes que já são conhecidos por suas propriedades biológicas. O efeito quelato termodinâmico também é explorado no planejamento de complexos metálicos bioativos. Esse efeito torna os

complexos quelatos mais estáveis termodinamicamente em relação aos seus análogos constituídos por ligantes monodentados⁵⁵⁻⁵⁷.

Entre os ligantes amplamente utilizados na química de coordenação com Ag(I), destacam-se as tiossemicarbazonas e semicarbazonas (FIGURA 11), devido à sua versatilidade sintética e notável atividade biológica. Esses ligantes derivam de reações de condensação entre aldeídos ou cetonas e tiossemicarbazidas ou semicarbazidas, respectivamente, e podem apresentar diferentes padrões de substituição nas posições terminais, o que permite ampla modulação de suas propriedades físico-químicas e biológicas⁵⁸⁻⁶⁰.



Tiossemicarbazona



Semicarbazona

$R', R'', R_1, R_2 = \text{alquil, aril, H.}$

FIGURA 11: Estrutura geral de compostos tiossemicarbazonas e semicarbazonas.

As tiossemicarbazonas (TSC) possuem como principal grupo funcional a tioamida ($-\text{C}=\text{S}$), que confere ao ligante uma natureza N,S-doadora. Esse grupo é responsável por fortes interações com metais moles, como o Ag(I), promovendo complexos estáveis e com estruturas bem definidas. A presença do enxofre e do nitrogênio permite a formação de quelatos bidentados ou tridentados, dependendo da estrutura do ligante, e frequentemente resulta em

compostos com geometria linear, trigonal ou tetraédrica ao redor do centro metálico⁵⁸⁻⁶⁰.

Por sua vez, as semicarbazonas (SCZ) são estruturalmente semelhantes às tiosemicarbazonas, mas apresentam uma amida ($-C=O$) no lugar da tioamida. Essa substituição altera significativamente o caráter doador do ligante, tornando-o predominantemente N,O-doador. A presença do oxigênio, mais eletronegativo que o enxofre, influencia as propriedades eletrônicas dos complexos, podendo afetar tanto sua solubilidade quanto sua reatividade e interação com alvos biológicos⁵⁸⁻⁶⁰.

Ambos os tipos de ligantes demonstraram ampla gama de atividades biológicas, como antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e até anti-inflamatória. A atividade citotóxica das tiosemicarbazonas, por exemplo, tem sido atribuída à sua habilidade em quelar metais biologicamente relevantes, como ferro e cobre, inibindo enzimas metalo-dependentes fundamentais para a proliferação celular, como a ribonucleotídeo redutase (RR), responsável pela conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, etapa crucial na síntese de DNA. Além disso, diversas tiosemicarbazonas têm demonstrado capacidade de inibir topoisomerasas, enzimas reguladoras da superenovelamento do DNA durante processos de replicação e transcrição, o que amplia ainda mais seu espectro de ação contra células tumorais⁶¹⁻⁶⁴.

Outro mecanismo relevante está relacionado à indução de estresse oxidativo, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que promovem danos mitocondriais, despolarização da membrana mitocondrial e ativação de vias de apoptose. Tais mecanismos são particularmente observados

em complexos metálicos contendo tiossemicarbazonas coordenadas, que favorecem o transporte e acúmulo intracelular de íons metálicos, potencializando o efeito citotóxico seletivo⁶⁴⁻⁶⁶.

Do ponto de vista químico, a coordenação com metais como Ag(I) também pode modificar profundamente a lipofilicidade, solubilidade e biodisponibilidade dos ligantes, além de reduzir sua toxicidade intrínseca por sequestrar grupos reativos ou por limitar sua interação direta com biomoléculas. O efeito quelato – ou seja, a maior estabilidade termodinâmica e cinética conferida por ligantes multidentados em relação aos monodentados – é fundamental nesse processo, pois favorece a formação de complexos mais resistentes à dissociação em meio fisiológico.

Apesar da ampla literatura sobre complexos metálicos com tiossemicarbazonas, ainda são relativamente escassos os estudos voltados especificamente aos complexos de Ag(I) com esses ligantes. No entanto, os poucos estudos existentes demonstram que os complexos de Ag(I) com tiossemicarbazonas ou semicarbazonas frequentemente apresentam atividade biológica superior à dos ligantes livres, evidenciando sua relevância no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Diante disso, torna-se evidente a importância de investigar de forma mais aprofundada os complexos de Ag(I) contendo esses ligantes, tanto para a ampliação do conhecimento sobre sua química de coordenação quanto para a exploração do seu potencial farmacológico, especialmente em um cenário crescente de resistência antimicrobiana e busca por novos agentes antitumorais seletivos e eficazes.

1.6 Planejamento estrutural e proposta de desenho molecular

Selecionou-se a prata(I) como centro metálico pela sua afinidade por doadores macios (N/S) e histórico de bioatividade antimicrobiana, buscando combinar estabilidade de coordenação com propriedades fisicoquímicas favoráveis (solubilidade, lipofilicidade e permeação celular). Dois blocos farmacofóricos complementares foram empregados:

- Derivados de 1,10-fenantrolina (N,N bidentado): phen, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batophen) e 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona). O núcleo fenantrolínico confere rigidez e capacidade de empilhamento $\pi-\pi$, enquanto as substituições modulam lipofilicidade (p.ex., grupos fenila em batophen) e quimiorredox (phendiona apresenta motivo quinonoide, potencialmente associado à geração/transferência de espécies reativas de oxigênio em microambientes celulares).
- (Tio)semicarbazonas (N,O ou N,S bidentado): provêm múltiplos sítios doadores, favorecem o efeito quelato e apresentam literatura de bioatividade relevante. A troca ($S \rightarrow O$) entre tiossemicarbazona e semicarbazona permite modular polaridade/lipofilicidade e, potencialmente, permeação e seletividade celular.

A combinação desses blocos visa equilibrar estabilidade do complexo, permeação (via aumento de lipofilicidade controlada) e interações biomoleculares (DNA, enzimas topoisomerases, proteínas plasmáticas), alinhando-se às hipóteses mecanísticas investigadas ao longo do trabalho.

Por fim um resumo estrutural dos compostos é exposto na FIGURA 12 a seguir e suas contribuições esperadas para cada parte da molécula.

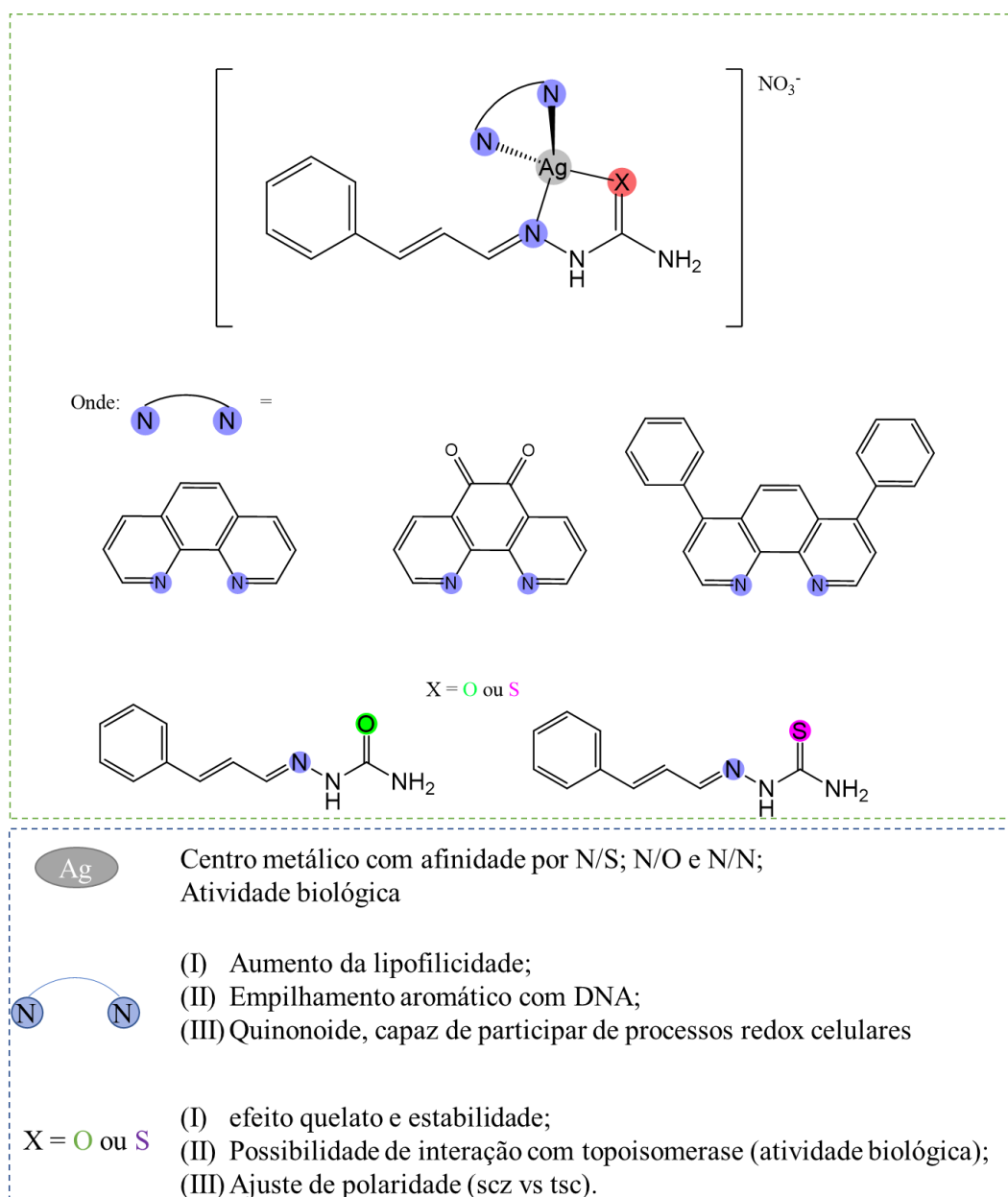


FIGURA 12: Planejamento estrutural dos complexos de prata(I) desenvolvidos neste trabalho e contribuição de cada fragmento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal sintetizar, caracterizar e realizar ensaios exploratórios de atividade biológica de complexos de prata(I) contendo ligantes das classes semicarbazona, tiossemicarbazona e derivados de fenantrolina, avaliando sua resposta *in vitro* frente a bactérias, linhagens tumorais humanas e parasitas do gênero *Leishmania* (*L.amazonensis* e *L.braziliensis*), com foco em potência (MIC/IC₅₀/EC₅₀), seletividade antitumoral (índice de seletividade) e espectro de ação em Gram⁺/Gram⁻, além de verificar a estabilidade em condições de ensaio.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar complexos de prata(I) com ligantes do tipo semicarbazona, tiossemicarbazona e derivados de 1,10-fenantrolina;
- Caracterizar estruturalmente os compostos por meio de técnicas como espectroscopia no infravermelho IV(FT-IR), UV-Vis, RMN (¹H/¹³C{¹H} e 2D), análise elementar (CHN) e espectrometria de massas, visando elucidar suas estruturas e modos de coordenação;
- Avaliar a estabilidade estrutural dos complexos em solventes a fim de verificar sua integridade durante os ensaios biológicos;
- Investigar a atividade antibacteriana dos compostos frente a cepas representativas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Avaliar a atividade antileishmanial frente a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, determinando EC₅₀ e índice de seletividade (vs. RAW 264.7);

- Estudar o potencial de interação dos complexos com biomoléculas, incluindo DNA (titulação/eletroforese) e inibição de topoisomerasas;
- Determinar o perfil de citotoxicidade dos complexos em linhagens celulares tumorais e em linhagem não tumoral, visando avaliar seletividade e potencial terapêutico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes e Reagentes

Os solventes metanol, etanol, diclorometano, clorofórmio, éter etílico, acetonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados sem purificação prévia (Synth® ou Sigma-Aldrich®). Ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados (Synth®), bicarbonato de sódio (Synth®), Brometo de potássio (KBr) (Sigma-Aldrich®) foi utilizado em FT-IR. Nitrato de prata (AgNO_3) (Sigma-Aldrich®) foi a fonte metálica. Os ligantes comerciais 1,10-fenantrolina (phen) de procedência NEON, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batophen) de procedência GFS. Para os ensaios enzimáticos, utilizaram-se Human Topoisomerase II α e Human Topoisomerase II β com seus tampões fornecidos (Assay Buffer, Dilution Buffer) e pBR322 superenovelado da Inspiralis®. O gel de agarose Kasvi e o plasmídeo pUC19 da Thermoscientif. Para microbiologia utilizaram-se caldo/ágar Mueller-Hinton (Kasvi®).

3.2 Síntese dos ligantes

A FIGURA 13 apresenta as estruturas químicas dos ligantes empregados neste trabalho, juntamente com suas respectivas abreviações.

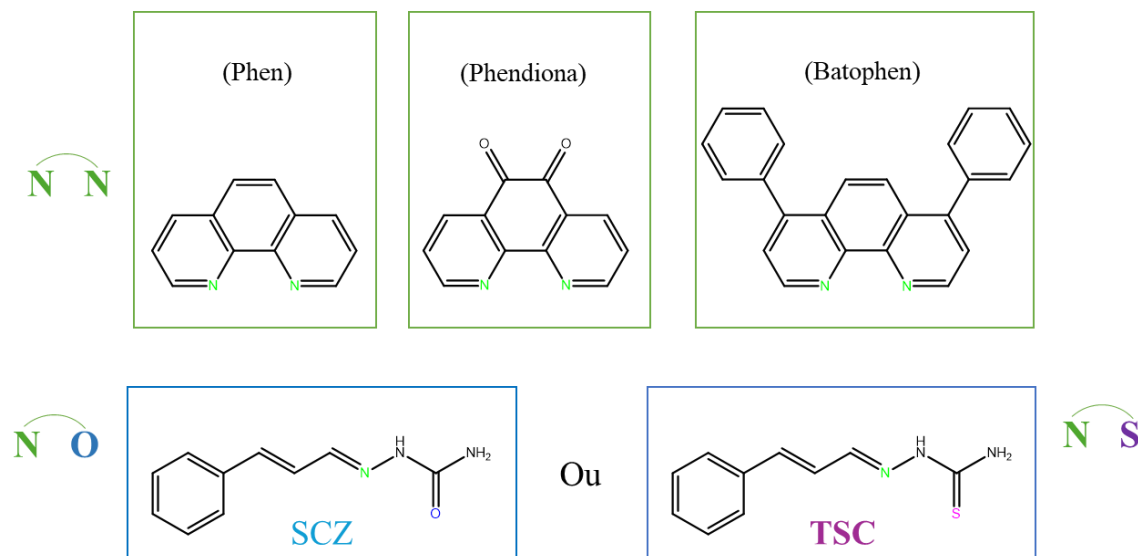


FIGURA 13: Estruturas químicas dos ligantes e pares doadores. As diiminas aromáticas derivadas da 1,10-fenantrolina atuam como quelantes $\kappa^2\text{N}_2$; a semicarbazona (SCZ) como $\kappa^2\text{N}_2\text{O}$ (N imina e O carbonila) e a tiossemicarbazona (TSC) como $\kappa^2\text{N}_2\text{S}$ (N imina e S tiona/tiolato). Os átomos doadores estão destacados em cores distintas.

3.2.1 Síntese dos ligantes Semicarbazona e Tiossemicarbazona

A síntese dos ligantes semicarbazona e tiossemicarbazona foi realizada com base em metodologias previamente descritas na literatura, com adaptações que envolvem o uso de ácido clorídrico diluído como catalisador da reação de condensação entre um aldeído aromático e a hidrazina correspondente⁶⁴⁻⁶⁵.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 0,56 mL de cinamaldeído (4,5 mmol), previamente solubilizados em 20 mL de uma mistura etanol:água (1:1, v/v). Posteriormente, adicionou-se 0,50 g de cloridrato de semicarbazida (4,5 mmol) para a síntese da semicarbazona, ou alternativamente, 0,41 g de tiosemicarbazida (4,5 mmol) para a obtenção da tiosemicarbazona. A seguir, foram adicionadas 5 gotas de HCl 0,8 mol L⁻¹ com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, atuando como agente catalisador da reação. A mistura reacional foi mantida sob refluxo com agitação constante por 24 h. Ao final do período, a suspensão resultante foi resfriada em banho de gelo para favorecer a precipitação do produto. O sólido formado foi isolado por filtração a vácuo, lavado com água destilada gelada e seco sob vácuo.

Rendimento: 74 % (0,62 g) semicarbazona e 94 % (0,87 g) tiosemicarbazona.

3.2.2 Síntese do ligante 1,10-fenantrolina-5,6-diona

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 1,00 g (5,60 mmol) de 1,10-fenantrolina e 4,50 g (38,0 mmol) de brometo de potássio (KBr) e lentamente, sobre banho de gelo, adicionou-se aos sólidos, uma mistura composta por 20 mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃) e 40 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Imediatamente após a adição, observou-se a liberação de gás castanho (Br₂), indicando o início do processo de oxidação.

A mistura reacional foi então aquecida a 90 °C sob agitação constante até cessar completamente a liberação do gás, o que indicava o consumo total do agente oxidante gerado in situ. Finalizada a reação, o meio foi cuidadosamente neutralizado com carbonato de potássio (K₂CO₃) até atingir um pH entre 6 e 7.

O sólido precipitado durante a neutralização foi removido por filtração a vácuo e descartado. A solução remanescente foi submetida à extração com diclorometano (3×30 mL), utilizando-se sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) como agente secante. Após filtração, o solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador, resultando na obtenção da phendiona como sólido amarelo claro.

Rendimento: 78 % (0,9100 g).

3.3 Síntese dos complexos de Ag(I)

3.3.1 Síntese dos complexos de Ag(I) com 1,10-fenantrolina

Em um balão reacional de 10 mL, foi adicionada uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) (82 mg, $4,8 \times 10^{-4}$ mol) dissolvida em 5 mL de acetonitrila. Em seguida, adicionou-se 1,10-fenantrolina (87 mg, $4,8 \times 10^{-4}$ mol) à solução, mantendo a agitação em temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, foi adicionado o ligante tiossemicarbazona ou semicarbazona, também na mesma proporção molar ($4,8 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética contínua por 1 h à temperatura ambiente. Ao final da reação, observou-se a formação de um precipitado. O sólido foi então isolado por filtração a vácuo, lavado com etanol gelado para remoção de impurezas solúveis e, por fim, seco sob vácuo até peso constante.

Rendimento: 60% (158 mg) $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$ e 85% (220 mg) $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{scz})]^+$

3.3.2 Síntese dos complexos de Ag(I) com 1,10-fenantrolina-5,6-diona

Em um balão reacional de 10 mL, foi adicionada uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) (82 mg, $4,8 \times 10^{-4}$ mol) em 5 mL de acetonitrila. Em seguida, adicionou-se 1,10-fenantrolina-5,6-diona (100 mg, $4,8 \times 10^{-4}$ mol), e a mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Na sequência, foi adicionado o ligante tiossemicarbazona ou semicarbazona na mesma proporção molar ($4,8 \times 10^{-4}$ mol).

Após a adição de todos os reagentes, a reação foi mantida sob agitação contínua por 1 h à temperatura ambiente. Ao final do tempo reacional, observou-se a formação de um precipitado, o qual foi isolado por filtração a vácuo, lavado com etanol gelado e seco sob vácuo até massa constante.

Rendimento: 72% (202 mg) $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$ e 88% (240 mg) $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$

3.3.3 Síntese dos complexos de Ag(I) com 4,7-difenil-1,10-fenantrolina

Em um balão reacional de 10 mL, foi adicionada uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) (82 mg, $4,8 \times 10^{-4}$ mol) em 5 mL de acetonitrila. Em seguida, adicionou-se 1,10-fenantrolina-5,6-diona (100 mg, $4,8 \times 10^{-4}$ mol), mantendo-se a mistura sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, foi adicionado o ligante tiossemicarbazona ou semicarbazona na mesma razão molar ($4,8 \times 10^{-4}$ mol).

A reação foi conduzida sob agitação contínua à temperatura ambiente por 1 h. Ao término do processo reacional, observou-se a formação

de um precipitado. O sólido foi então isolado por filtração a vácuo, lavado com etanol gelado para remover impurezas residuais e, em seguida, seco sob vácuo até massa constante.

Rendimento: 72% (202 mg) $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{tsc})]^+$ e 88% (240 mg) $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$

3.4 Equipamentos e Metodologia

3.4.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no estado sólido utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU® com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21 na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} . As amostras no estado sólido foram diluídas em KBr, mantida em estufa a 100 °C, na proporção 1/100 (amostra/KBr).

3.4.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros foram obtidos com auxílio do espectrômetro SHIMADZU 1650PC, duplo-feixe. Os espectros foram analisados a partir de soluções $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em DMSO. A região de varredura escolhida foi de 700 a 200 nm em caminho óptico de 1,0 cm em cubetas de quartzo. Os espectros foram obtidos utilizando os softwares UVProb 2.42.

3.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Mapas de Contornos (COSY, $^1\text{H}^1\text{H}$, HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ e HMBC) foi utilizado um espectrômetro BRUKER® Avance III - Nanobay 400MHz localizado no

laboratório do Departamento de Química da UFSCar. Os solventes utilizados nas análises foram o DMSO-d₆ na proporção 5 mg de amostra para 450 µL de solvente deuterado. Os espectros foram tratados utilizando o software MestReNova® versão 12.02-20910.

3.4.4 Análise Elementar

As porcentagens de carbono, nitrogênio, enxofre e hidrogênio foram obtidas utilizando o equipamento Fisons-EA1108 (CHNS-O) da CE *Instruments* com o programa EAGER 200 disponíveis na central analítica do Departamento de Química da UFSCar. Pesou-se aproximadamente 1,0 mg das amostras em uma balança Sartorius Micro (XM-1000 P) que apresenta erro igual a 0,005 mg.

3.4.5 Medidas de condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram feitas no equipamento MARCONI modelo MA 521 pertencente ao grupo LABBES (Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biosensores, Eletroanalítica e Sensores) do Departamento de Química-UFSCar. Foram preparadas soluções dos complexos nas concentrações de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO.

3.4.6 Espectrometria de massas de alta resolução UHPLC-QTOF-MS

As análises de massa de alta resolução foi realizada pela Dra Karine Zanotti do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar. A amostra foi solubilizada em 1000 µL de DMSO grau LC-MS e diluída para a concentração de 1 ppm em ACN grau LC-MS. A fase móvel no modo isocrático foi

constituída por 100 % acetonitrila acidificada com 0,1 % de ácido fórmico. A vazão da fase móvel foi de 0,200 mL min⁻¹ e o volume de injeção de 5 µL. Não houve utilização de coluna, sendo feita injeção direta. A análise das amostras foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência acoplado ao 6545 Q-TOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com uma interface *eletrospray* (ESI) de Jet no modo positivo, empregando os seguintes parâmetros para a ionização.

TABELA 2: Parâmetros utilizados na ionização para a detecção dos padrões isotópicos.

Tipo de ionização	ESI+
Temperatura do gás (°C)	320
Fluxo do gás (L min ⁻¹)	12
Nebulizador (Psi)	35
Temperatura da barreira térmica do gás (°C)	300
Temperatura da barreira térmica do fluxo (°C)	10
VCap	2400
Voltagem do Nozze (V)	700
Fragmentador (eV)	30 e 40

Skimmer	65
Energia de colisão	-
OctopoleRFPeak	750

O erro em massas foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS (erro máximo aceitável de 5 ppm). O espectro foi adquirido monitorando uma faixa entre 100 a 1000 m/z, taxa de varredura de 3 espectros s⁻¹ e processados pelo *software* Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00.

3.4.7 Linhagens celulares

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens tumorais humanas de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC. HTB-26), tumoral de pulmão A549 (ATCC N. CCL-185), tumoral de ovário A2780 (ECACC N°. 93112517) e a linhagem não tumoral de pulmão MRC-5 (ATCC N. CCL-171). As linhagens MDA-MB-231, A549 e MRC-5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Vitrocell), suplementado com 10% de FBS, e as células A2780 foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute; Vitrocell), também contendo 10 % de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em estufa umidificada contendo 5 % de CO₂ à temperatura de 37 °C.

3.4.8 Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT)

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, em 150 μL de meio suplementado. Após 24 h de incubação (5 % de CO_2 a 37°C), as células foram expostas a uma faixa de concentrações do composto entre 0,05 e 50 μM , preparada por diluições seriadas a partir de soluções estoque em DMSO, mantendo-se constante a fração de DMSO em todos os poços. As placas foram novamente mantidas na incubadora (5 % de CO_2 a 37°C) por 48 h. Posteriormente, adicionaram-se 50 μL de uma solução de MTT (1 mg mL^{-1}) em cada poço, a qual foi mantida em incubação por 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente removida e adicionaram-se 100 μL de isopropanol por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio do leitor de microplacas (Epoch) e os valores de IC_{50} foram determinados utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0.2.

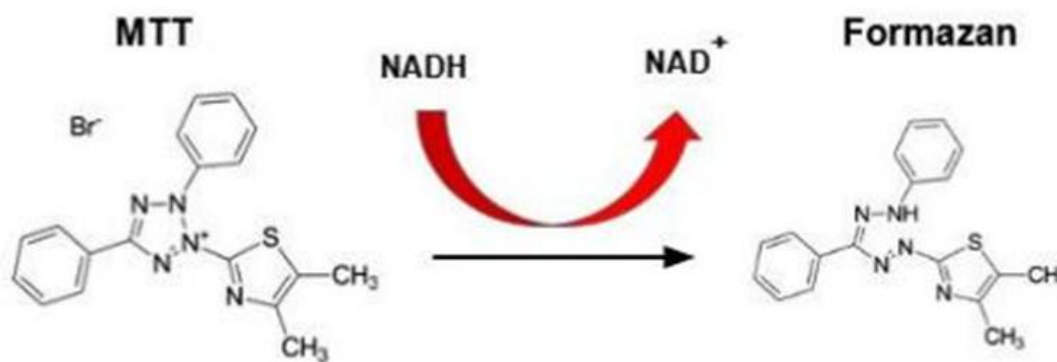


FIGURA 14: Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.

3.4.9 Ensaio de Eficiência Clonogênica

As células (MDA-MB-231) foram semeadas (400 células/poço) em placas de 6 poços e incubadas a 5 % de CO₂ e 37 °C por 24 h. Em seguida, adicionou-se o complexo em diferentes concentrações, determinadas com base nos resultados de IC₅₀. As placas foram incubadas por mais 48 h, o meio de cultura foi removido e adicionou-se novo meio de cultura. As placas foram mantidas em estufa por 8 dias. Após esse período, o meio de cultura foi removido, as colônias foram fixadas e coradas em uma solução metanol: água (1:1) com 0,5 % de cristal violeta por 20 min. A quantidade de colônias foi contabilizada utilizando o software Image J.

3.4.10 Ensaio de Morfologia celular campo claro

A avaliação da alteração morfológica foi realizada para as células MDA-MB-231. As células foram semeadas em placas de 96 poços (1,0 x 10⁴ células/poço) e mantidas em estufa (37 °C e 5 % de CO₂) por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (1/2 x IC₅₀ ; 1 x IC₅₀ ; 2 x IC₅₀) e as imagens nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h foram registradas utilizando o microscópio CELENA® S Logos Biosystems. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.4.11 Ensaio de morfologia celular por fluorescência (Green plasma/DAPI)

A análise morfológica por fluorescência com CellMask™ Green (membrana plasmática) e DAPI (núcleo) foi realizada apenas para o composto mais ativo, [Ag(phendiona)(scz)]⁺, na linhagem MDA-MB-231. As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de 1,5 x 10⁴

células/poço, em 150 µL de meio de cultura suplementado com 10 % de FBS, e incubadas por 24 h a 37 °C e 5 % de CO₂. Após isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações já descritas de cada composto e o controle com 0,5 % de DMSO e incubadas por 48 h. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e as células foram fixadas com metanol (50 µL) por 5 min, o metanol foi removido e foram adicionados 50 µL da solução CellMask Green (solução de trabalho 1x) e incubada por 5 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C). A seguir, o marcador foi removido e as células foram lavadas 2x com PBS (50 µL) cuidadosamente. Após lavar com PBS, adicionou-se 50 µL de DAPI (300 nM) e incubou-se à temperatura ambiente por mais 10 min. As células foram lavadas novamente com PBS 2x e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (CELENA® S Logos Biosystems) com os filtros adequados.

3.4.12 Ensaio de cultura celular 3D

Para o experimento de cultura 3D, foi utilizado o Kit Bio-print de 96 poços da tecnologia de Cultura Celular 3D Magnética (m3D). Em uma garrafa de 25 cm², contendo a linhagem celular A2780, adicionou-se 150 µL de uma solução contendo nanopartículas (NanoShuttle – PL), para magnetizar as células. Após 24 h, as células foram tripsinizadas, contadas para o ajuste da concentração das células, e em seguida semeadas em uma placa de cultura repelente de 96 poços (1500 células/poço). A placa de cultura foi colocada sob drives magnéticos a fim de que formassem esferoides através das forças magnéticas dos ímãs. A placa foi armazenada em estufa a 37 °C e 5 % CO₂; a formação e crescimento dos esferoides foi sendo acompanhado por um microscópio CELENA® S Digital Imaging System (Logos Biosystems). Com os esferoides formados, adicionaram-se diferentes concentrações do complexo em estudo e o efeito foi monitorado por 6 dias. No 6º dia, adicionaram-se os

marcadores fluorescentes DAPI e PI para análise de morte celular, procedendo-se à aquisição de imagens com os filtros apropriados.

3.4.13 Ensaio de Atividade Anti-Leishmania

Os ensaios biológicos envolvendo *Leishmania* e macrófagos derivados de medula óssea foram realizados em parceria com o Prof. Danilo Ciccone Miguel e o aluno Marcus Sávio Araujo Garcia do Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania* (LEBIL) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os experimentos foram conduzidos utilizando formas promastigotas das duas espécies, cultivadas em meio Schneider's *Drosophila* (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10 % FBS, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, incubadas a 26 °C até atingirem a fase logarítmica de crescimento.

Os complexos foram inicialmente solubilizados em DMSO (concentração final $\leq 1\%$ v/v) e diluídos em meio de cultura para obtenção de concentrações variando de 0,39 a 100 µM por diluições seriadas. As células parasitárias ($5,0 \times 10^6$ promastigotas mL⁻¹) foram semeadas em placas de 96 poços contendo 180 µL de suspensão por poço, e 20 µL das soluções dos compostos foram adicionados. As placas foram incubadas por 72 h a 26 °C.

A viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando o reagente MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), adicionado em volume de 20 µL (5 mg mL⁻¹) em cada poço, com incubação adicional por 4 h. Em seguida, 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan, e a absorbância foi lida em leitor de microplacas (Epoch – BioTek®) a 540 nm. A concentração efetiva média

(EC₅₀) foi determinada por ajuste não linear da curva de dose-resposta no software GraphPad Prism 8.0.2®.

A toxicidade dos compostos foi avaliada na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 (5×10^4 células/mL) cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de FBS e incubados a 37 °C com 5 % de CO₂.

Após 24 h de tratamento com os compostos nas mesmas concentrações, a viabilidade celular também foi medida por ensaio de MTT. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre o IC₅₀ nos macrófagos e o EC₅₀ obtido frente aos promastigotas de *Leishmania*.

3.4.14 Inibição Bacteriana

As suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 h, em Caldo Mueller-Hinton (MH), 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⁻¹). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de microrganismos.

3.4.15 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras consideradas ativas foram submetidos a avaliação quantitativa da extensão da atividade antimicrobiana utilizando a metodologia de microdiluição em caldo (ELOFF, 1998), em triplicata. Prepararam-se soluções dos compostas na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em caldo Mueller-Hinton (MH) contendo 1% (v/v) de DMSO (fração mantida constante em todas as diluições). A solução inicial foi diluída em série (1:2) em microtubos, conforme FIGURA 15.

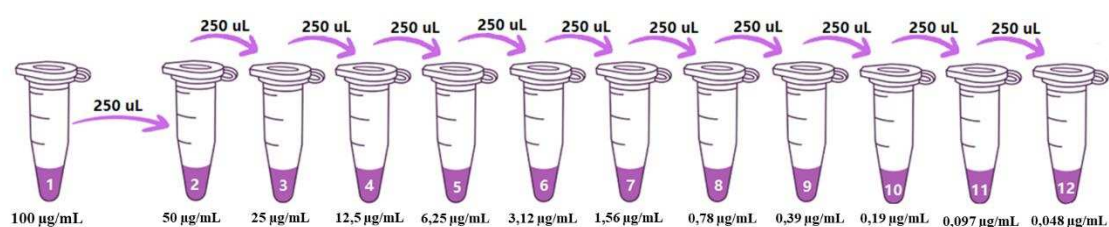


FIGURA 15: Preparo de amostras por diluição seriada (1:2) para determinação quantitativa da atividade antimicrobiana.

Em placa de 96 poços, 50 µL de cada solução (1-12) foram incubadas a 37 °C com 50 µL de inóculo preparado em solução salina 0,9 % (m/v) a 1×10^8 UFC mL^{-1} e posteriormente diluído em MH até 1×10^6 UFC mL^{-1} , obtendo-se uma concentração final no poço de 5×10^5 UFC mL^{-1} . Após incubação por 24 h, 50 µL de solução de reagente de viabilidade celular cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC) $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foi adicionado nos poços e incubados por mais 3 h a 37 °C. Os dados de absorbância foram adquiridos em espectrofotômetro com suporte para placa (620 nm). Apenas meio de cultura foi utilizado como controle negativo e ciprofloxacina a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ como controle positivo. Um branco de amostra, composto por 50 µL de amostra e 50 µL de meio de cultura foi feito para descontar a coloração intrínseca dos compostos.

A faixa de concentração testada para os compostos correspondeu de 500 a 0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como descrito na FIGURA 16.

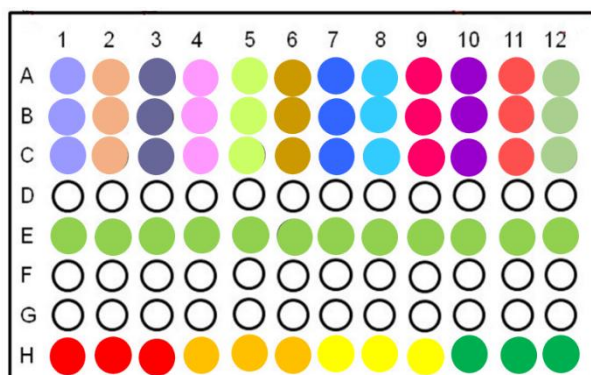


FIGURA 16: Preparo das placas de inoculação para teste quantitativo de atividade antimicrobiana. CC: controle de coloração; CM: controle do meio de cultura; CN: controle negativo; CP: controle positivo; CN: controle negativo; CS: controle de surfactante (DMSO).

3.4.16 Interação com o ct-DNA via espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis)

Para realizar o teste de interação com DNA, primeiramente, foi preparada uma solução tampão Trizma (Tris-HCl 84,0 mM; 16,0 mM de Trisbase, pH = 7,4; procedência Sigma-Aldrich®) em temperatura ambiente. Nesse trabalho foi utilizada uma solução estoque de DNA do timo de bezerro (*calftymus* / ct-DNA, procedência Sigma-Aldrich®) 0,5 mg mL⁻¹ preparada na solução tampão Trizma em temperatura ambiente. Antes do procedimento a solução foi estocada em geladeira a aproximadamente 4 °C para evitar degradação da biomolécula e verificado a razão da absorbância comprimentos de onda 260 e 280 nm (A_{260} / A_{280}) acima de 1,8 indicando que o ct-DNA está com a quantidade aceitável de proteínas contaminantes que podem prejudicar a

interação com os compostos estudados. A concentração foi calculada utilizando a absortividade molar conhecida na literatura ($\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$) e aplicando a lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$). Após a determinação, a solução foi diluída para uma concentração final de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A constante de ligação (K_b) foi calculada aplicando-se a fórmula 1. Neste experimento, as concentrações dos complexos foram mantidas fixas em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, onde variou-se as concentrações de DNA de $1,0 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, vale salientar que as adições de DNA foram feitas tanto na cubeta de trabalho quanto na do branco para eliminar a absorbância da biomolécula.

$$\frac{[\text{DNA}]}{\epsilon A - \epsilon f} = \frac{[\text{DNA}]}{\epsilon b - \epsilon f} + \frac{1}{K_b(\epsilon b - \epsilon f)} \quad \text{Fórmula 1}$$

3.4.17 Interação com plasmídeo superenovelado (pUC19) via eletroforese

Para os testes, os complexos foram inicialmente diluídos em três concentrações ($20, 10$ e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Em seguida, em cada microtubo, adicionaram-se $3 \mu\text{L}$ dessas soluções a uma mistura contendo $26,5 \mu\text{L}$ de água deionizada e $0,5 \mu\text{L}$ do plasmídeo pUC19, totalizando um volume final de ensaio de $30 \mu\text{L}$. As soluções foram incubadas a 37°C por 24 h . Após o tempo transcorrido as amostras foram retiradas do banho termostático e adicionou-se $15 \mu\text{L}$ de STEB (40% de sacarose, 100 mM de Tris-HCl, $\text{pH} = 7,5$, 1 mM de EDTA, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de azul de bromofenol), logo em seguida centrifugou-se a 5000 rpm por 5 min , e $20 \mu\text{L}$ de cada amostra foram aplicados nos respectivos poços do gel de agarose 1% (525 mg de agarose em 53 mL de TBE $1\times$). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE $1\times$ a 60 V por 2 h . Após esse período, o gel foi corado com brometo de etídio e revelado no

fotodocumentador Gel DocTM EZ, a imagem obtida foi tratada no software ImageLabTM 6.0.0 (BioRad).

3.4.18 Inibição TOPO II α e II β via eletroforese

O ensaio de inibição da enzima DNA-Topoisomerase II α foi realizado com o kit de relaxação do DNA fornecido pela Inspiralis Limited. No ensaio foi usado 0,5 μ L de DNA (pBR322), 3,0 μ L de tampão de ensaio (50 mM Tris-HCl (pH = 7,5); 125 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT 100 μ g ml⁻¹ albumina) e 1,0 μ L (1,0 mM) de ATP para a preparação do mix. A solução de ensaio era composta por 4,5 μ L de mix, 21,5 μ L de água, 3,0 μ L dos complexos e, por fim, 1,0 μ L da topoII. Os complexos foram testados em diferentes concentrações (20, 10 e 1 μ M). Para a realização do ensaio, as amostras foram mantidas incubadas a 37 °C por 45 min. Posteriormente foram adicionados 15 μ L de STEB (40 % de sacarose, 100 mM de Tris-HCl, pH = 7,4, 1 mM de EDTA, 0,5 mg mL⁻¹ de azul de bromofenol). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, a partir do sobrenadante, 20 μ L da fase aquosa foram adicionados no gel de agarose 1 %, em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 7,2. A corrida eletroforética se procedeu em 60 V por 2 h. A revelação do gel e o tratamento das imagens foram realizados da mesma forma descrita no item anterior (3.4.17). O ensaio eletroforético com a enzima Topoisomerase II β segue o mesmo protocolo descrito para Topoisomerase II α .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização dos ligantes

A reação entre o *trans*-cinamaldeído e a semicarbazida ou tiosemicarbazida é caracterizada como uma condensação tipo Schiff, também conhecida como reação de formação de iminas (FIGURA 17). Nessa reação, o par de elétrons do nitrogênio nucleofílico da amina (-NH_2) da (tio)semicarbazida ataca o carbono da carbonila (C=O) do aldeído, cuja densidade eletrônica é parcialmente positiva devido ao efeito indutivo provocado pelo átomo mais eletronegativo, gerando um intermediário instável de carbinolamina, o qual sofre eliminação de água para originar a ligação azometina (C=N) formando assim, a (tio)semicarbazona^{70,71}.

Para formar (tio)semicarbazonas por catálise ácida, o caminho produtivo é protonar (parcialmente) a carbonila (aldeído/cetona) e manter a amina terminal da (tio)semicarbazida predominantemente neutra para que ela ataque. Protonar a amina no início a torna não nucleofílica e desacelera a reação. Por isso o pH ótimo é levemente ácido (4–5): ácido o suficiente para ativar a carbonila e favorecer a desidratação da carbinolamina, mas não tão ácido a ponto de bloquear o ataque nucleofílico⁷¹⁻⁷³.

Essas estruturas são conhecidas por sua capacidade de atuar como ligantes polidentados, devido à presença de átomos doadores de par de elétrons. As semicarbazonas geralmente atuam como ligantes N,O, utilizando o nitrogênio da imina e o oxigênio carbonílico como sítios coordenantes. Por outro lado, as tiosemicarbazonas, por conterem um grupo tiocarbonila (C=S), funcionam como ligantes N,S, com coordenação preferencial via nitrogênio da azometina e o enxofre da tiona⁷⁰⁻⁷³.

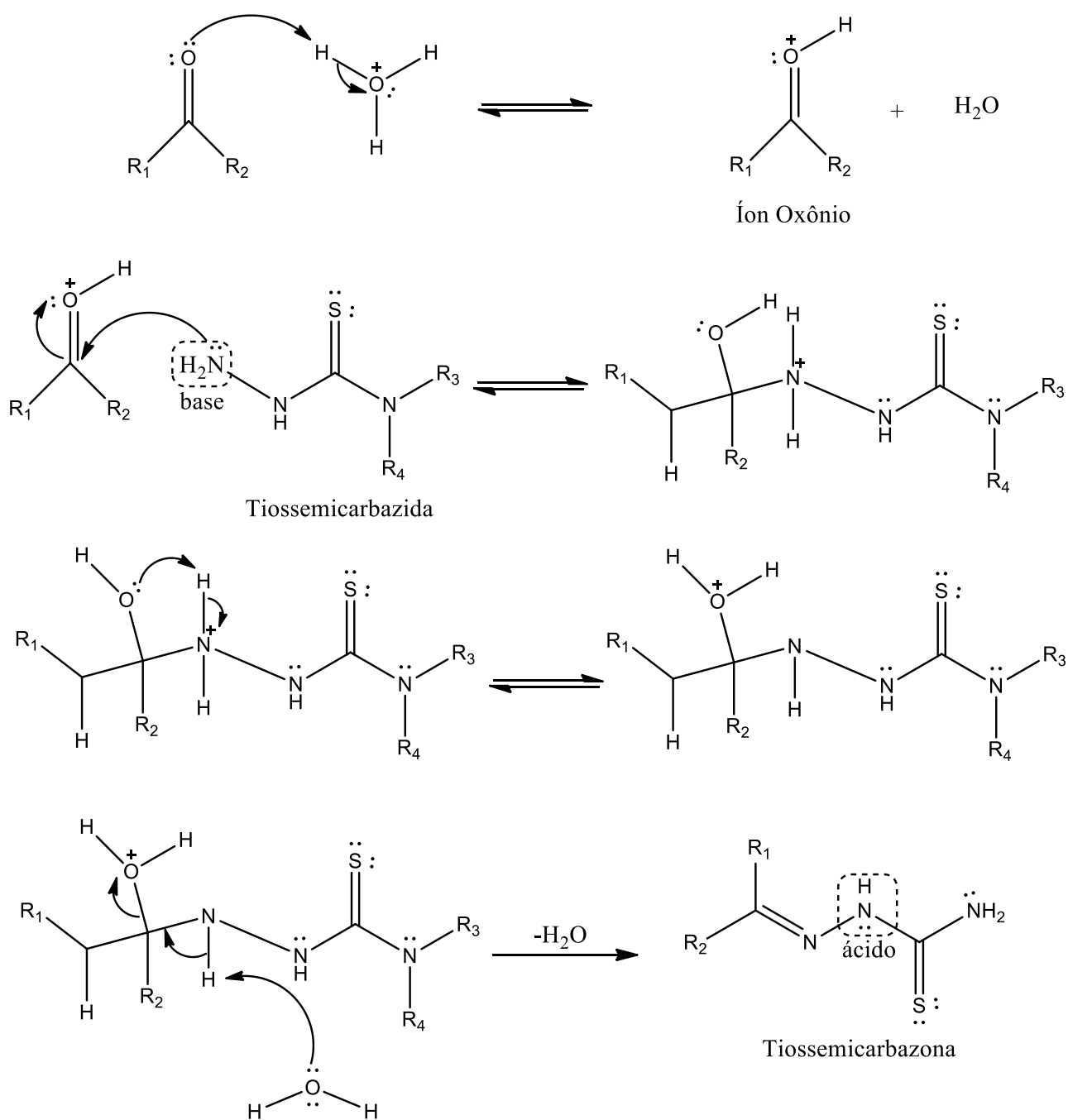


FIGURA 17: Mecanismo de reação proposto para a formação da tiosemicarbazona cinemaldeído TSC.

A confirmação estrutural dos ligantes sintetizados é essencial para assegurar a correta formação das (tio)semicarbazonas e, conseqüentemente,

garantir a reprodutibilidade dos complexos metálicos derivados. Dentre as técnicas utilizadas para essa caracterização, destaca-se a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H RMN), que fornece informações detalhadas sobre os ambientes químicos dos átomos de hidrogênio presentes na molécula^{74,75}.

Considerando que as (tio)semicarbazonas derivadas do cinemaldeído já são compostos bem estabelecidos na literatura, os espectros de RMN ^1H foram obtidos principalmente com o objetivo de comparação com os respectivos complexos metálicos, permitindo identificar possíveis alterações nos deslocamentos químicos decorrentes da coordenação ao íon Ag(I) . A seguir, são apresentados os espectros dos ligantes livres e suas atribuições mais relevantes.

A FIGURA 18 mostra o espectro de RMN de ^1H do ligante semicarbazona, obtido em solução de DMSO-d_6 .

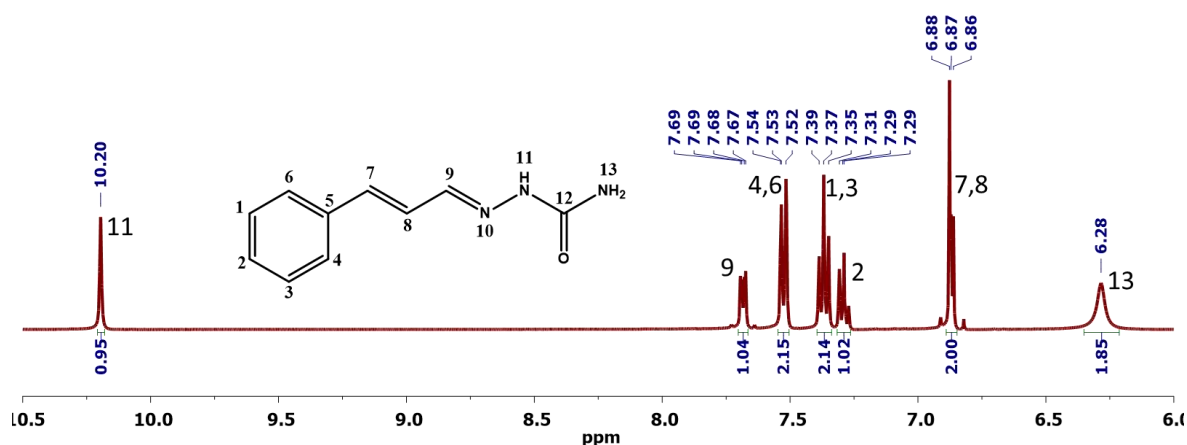


FIGURA 18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) do ligante Semicarbazona em DMSO-d_6 .

O espectro de RMN de ^1H apresenta um sinal singlete em 6,28 ppm, atribuído aos hidrogênios do grupo amina terminal ($-\text{NH}_2$), que não apresentam acoplamento visível. O hidrogênio mais ácido da molécula, correspondente ao hidrogênio imínico ($-\text{CH}=\text{N}-$), aparece como um singlete característico em 10,20 ppm, evidenciando sua desproteção e forte desblindagem.

Na porção vinílica da molécula, observa-se um sinal em 6,88 ppm, correspondente ao acoplamento vicinal entre os hidrogênios da dupla ligação. Um segundo sinal, em 7,69 ppm, é atribuído ao hidrogênio vinílico localizado próximo ao átomo de nitrogênio da azometina, sofrendo influência do grupo eletronegativo.

A região aromática apresenta três conjuntos de sinais bem definidos: um tripleto em 7,29 ppm, correspondente ao hidrogênio em posição *para* do anel fenil; outro tripleto em 7,37 ppm, relativo aos hidrogênios em posição *meta*; e, por fim, um duplete em 7,52 ppm atribuído aos hidrogênios *orto*, resultantes do acoplamento com os vizinhos.

A estrutura da tiossemicarbazona é semelhante à da semicarbazona, com a principal diferença sendo a substituição do oxigênio carbonílico por um átomo de enxofre. Como consequência, os espectros são semelhantes, apresentando apenas pequenas variações nos deslocamentos químicos. A FIGURA 19 mostra o espectro de RMN de ^1H do ligante tiossemicarbazona, também registrado em DMSO- d_6 .

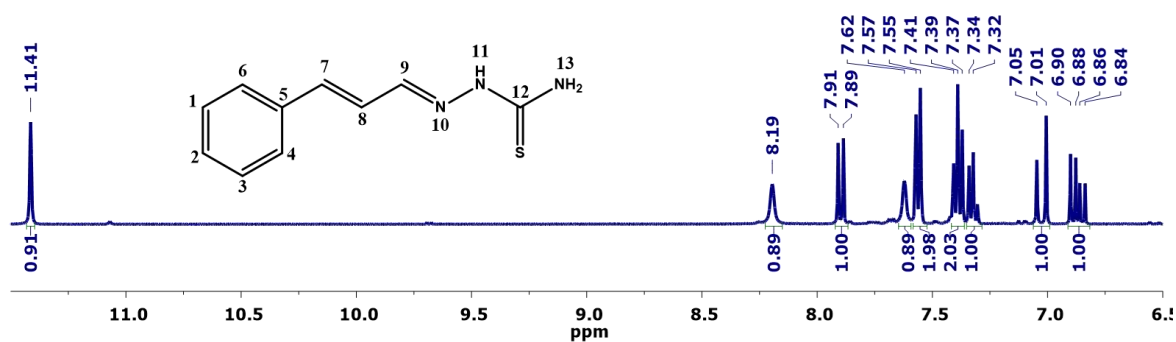


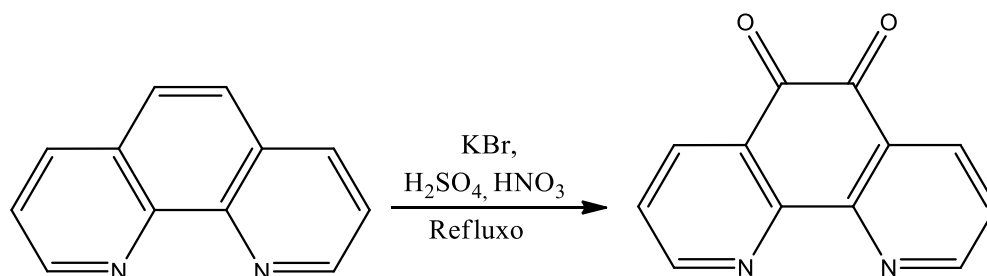
FIGURA 19: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) do ligante tiossemicarbazona em DMSO-d₆

O sinal mais desviado para baixo campo, em 11,41 ppm, é atribuído ao hidrogênio imínico, que sofre maior desblindagem devido à proximidade com o grupo C=S. Os hidrogênios da amina terminal originam dois singletos distintos, em 8,19 ppm e 7,62 ppm, sugerindo ambientes químicos ligeiramente diferentes, possivelmente devido à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares. Na região aromática, observa-se um duplete em 7,28 ppm, atribuído a dois hidrogênios do anel fenil, e um múltiplo centrado em 7,37 ppm, correspondente aos demais três hidrogênios do anel.

Os sinais relativos à porção alílica incluem um singlete em 7,90 ppm, associado ao hidrogênio mais próximo ao grupo imina, enquanto os demais hidrogênios alílicos aparecem como sinais sobrepostos em 7,00 e 6,88 ppm.

A síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona) é bastante descrita na literatura, trata-se de um composto bastante sensível ao pH. O ligante foi obtido a partir da oxidação eletrofílica da 1,10-fenantrolina utilizando uma mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico em presença catalítica de brometo de potássio (KBr). Essa reação é um exemplo clássico de oxidação

aromática em anel, promovida por espécies reativas de nitrogênio e bromo geradas *in situ*.



Esquema 1. Rota sintética da phendiona

A 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona) é um ligante bidentado N,N que quelata diversos íons de metais de transição. O motivo quinonoide confere caráter redox e capacidade de aceitar/transferir elétrons, influenciando reatividade e interações supramoleculares. Tanto a phendiona livre quanto seus complexos metálicos têm sido associados a atividades biológicas relevantes, incluindo ação antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e citotóxica antitumoral.

Neste trabalho, foram sintetizados e caracterizados três ligantes principais: semicarbazona (SCZ), tiosemicarbazona (TSC) e 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona). Os ligantes 1,10-fenantrolina (phen) e 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batophen) foram empregados como reagentes comerciais e, por isso, não tiveram suas sínteses discutidas aqui.

Para efeito de comparação espectroscópica e suporte à atribuição dos sinais nos complexos metálicos correspondentes, a próxima seção apresenta uma breve discussão dos espectros de RMN de ^1H dos três ligantes derivados da fenantrolina (ver FIGURA 20), destacando as principais diferenças estruturais e eletrônicas entre eles.

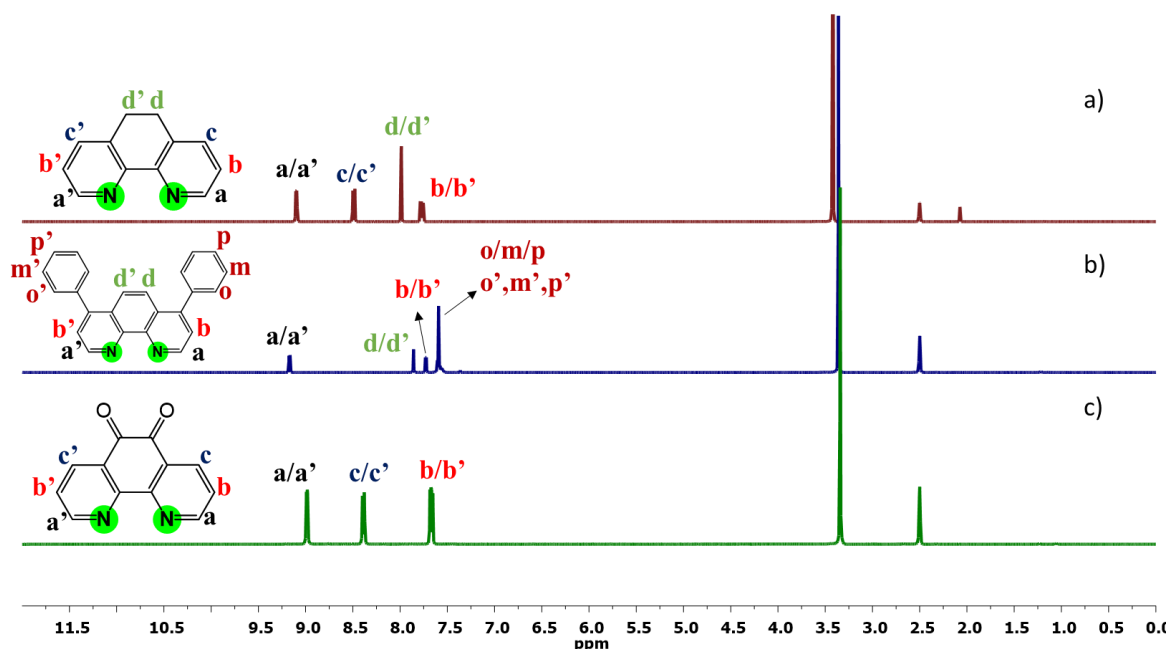


FIGURA 20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) para os ligantes, a) phen, b) batophen e c) phendiona.

Devido à equivalência dos hidrogênios da phen, observam-se quatro sinais correspondentes aos hidrogênios $\text{H}_{\text{a,a'}}$, $\text{H}_{\text{b/b'}}$, $\text{H}_{\text{c/c'}}$ e $\text{H}_{\text{d/d'}}$ em seu espectro. Os sinais presentes em 9,11 ppm, 7,79 ppm e 8,50 ppm correspondem aos hidrogênios metínicos $\text{H}_{\text{a/a'}}$, $\text{H}_{\text{b/b'}}$ e $\text{H}_{\text{c/c'}}$ respectivamente, tais picos são observados como dubleto de dubletos. O sinal em 8,0 ppm correspondente a $\text{H}_{\text{d/d'}}$ é observado como um singlete.

Batophen apresenta um padrão semelhante ao da phen para os hidrogênios do sistema fenantrolínico, com sinais característicos para $\text{H}_{\text{a/a'}}$, $\text{H}_{\text{b/b'}}$ e $\text{H}_{\text{d/d'}}$. Adicionalmente, surgem sinais no campo entre 7,30 e 7,80 ppm atribuídos aos hidrogênios dos dois anéis fenilica nas posições 4 e 7. Esses anéis são simétricos e contribuem com cinco hidrogênios cada, totalizando dez hidrogênios aromáticos, que aparecem como multipletos sobrepostos, típicos de anéis fenila não substituídos.

Por fim, o espectro de RMN de ^1H da phendiona exibe um perfil característico devido à presença dos grupos carbonila nas posições 5 e 6 da fenantrolina. Esses grupos eletronegativos retiram densidade eletrônica do sistema, provocando desblindagem magnética dos prótons aromáticos vizinhos. Como consequência, observa-se um deslocamento para campo mais baixo, isto é, para valores mais altos de δ (ppm). O espectro apresenta três sinais atribuídos aos prótons Ha/a', Hb/b' e Hc/c', totalizando seis hidrogênios aromáticos equivalentes em pares. A ausência dos prótons nas posições 5 e 6 (substituídos por C=O) altera o padrão de acoplamento observado na phen, resultando em uma simplificação do espectro.

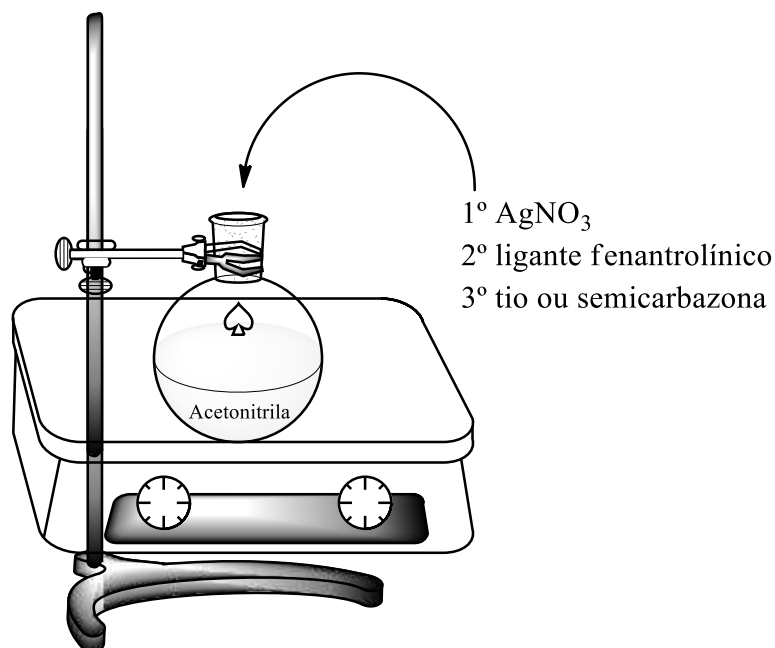
TABELA 3: Dados de RMN de ^1H para os ligantes fenantrolínicos e constantes de acoplamento em DMSO- d_6 .

^1H	Phen	Phendiona	Batophen
a/a'	9,12 (m, 2H)	8.99 (dd, $J = 4.5, 1.2$ Hz, 2H)	9.18 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H)
b/b'	7,77 (dd, $J = 8.0, 4.3$ Hz, 2H)	7.67 (dd, $J = 7.8, 4.7$ Hz, 2H)	7.87 (s, 2H)
c/c'	8,49 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H)	8.39 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 2H)	-
d/d'	7,98 (s, 2H)		7.74 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H)
o/m/p			7.63 (m, 10H)

*o = *orto*; m = *meta* e p = *para*

4.2 Síntese e caracterização dos complexos

Os complexos metálicos foram obtidos por meio da reação entre o sal de prata (AgNO_3) e um ligante fenantrolínico (phen, batophen ou phendiona) em combinação com semicarbazona ou tiossemicarbazona, na proporção molar de 1:1:1 ($\text{Ag}:\text{fenantrolina}:(\text{tio})\text{semicarbazona}$). As reações foram conduzidas em acetonitrila, sob agitação constante à temperatura ambiente por 2 h. Devido à fotossensibilidade dos sais e complexos de prata, todas as etapas foram realizadas sob proteção rigorosa da luz, a fim de evitar a fotoredução da prata e garantir a estabilidade das espécies formadas.



Esquema 2: Síntese dos complexos com ligantes semicarbazona e tiossemicarbazona com diferentes fenantrolinas.

Após 2 h de reação, foram observados precipitados sólidos com colorações distintas, atribuídas à natureza dos ligantes utilizados. Os complexos contendo 1,10-fenantrolina (phen) e 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batophen)

apresentaram coloração branca, enquanto aqueles contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona) formaram precipitados amarelos. A coloração dos complexos está relacionada, predominantemente, a transições eletrônicas de ligantes ou de transferência de carga, uma vez que o íon Ag(I), com configuração eletrônica $[\text{Kr}]4d^{10}$, possui orbital d completamente preenchido, impedindo transições $d-d$.

A análise de carbono, hidrogênio, nitrogênio e, quando aplicável, enxofre (CHNS) foi empregada para verificar a consistência entre os valores experimentais e os teóricos calculados para os complexos $[\text{Ag}(\text{L})(\text{L}')^+]$, os dados obtidos encontram-se na TABELA 4.

TABELA 4: Valores experimentais e teóricos obtidos via análise elementar para os complexos de Ag(I).

Composto	% C (teórico)	% N (teórico)	% H (teórico)	% S (teórico)
$[\text{Ag}(\text{phen})(\text{scz})]^+$	49,63 (49,00)	15,52 (15,58)	4,01 (3,55)	
$[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$	47,45 (47,58)	15,36 (15,13)	3,74 (3,45)	5,82 (5,77)
$[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	46,96 (46,41)	14,78 (14,76)	3,08 (3,01)	
$[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$	45,32 (45,16)	14,72 (14,36)	3,07 (2,93)	5,26 (5,44)
$[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$	58,97 (59,06)	11,95 (12,15)	4,53 (3,94)	
$[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{tsc})]^+$	57,56 (57,72)	11,84 (11,88)	3,91 (3,85)	4,48 (4,53)

De maneira geral, observa-se uma boa concordância entre os valores teóricos e experimentais, com desvios dentro dos limites aceitáveis para esse tipo de análise (geralmente até $\pm 0,4 \%$)⁷⁵. Tal concordância fornece suporte à formulação proposta para os complexos, sugerindo que os produtos

foram obtidos com alta pureza e com a proporção esperada 1:1:1 entre o íon Ag(I), o ligante do tipo diimina (phen, phendiona ou batophen) e o ligante tiosemicarbazona (scz ou tsc). Nos complexos contendo o ligante tiosemicarbazona (tsc), também foi determinada a porcentagem de enxofre, com valores experimentais muito próximos dos teóricos.

O complexo $[Ag(phen)(tsc)]^+$ apresentou 5,82% de S (teórico: 5,77%), enquanto $[Ag(batophen)(tsc)]^+$ exibiu 4,48% (teórico: 4,53%).

Os teores de carbono e nitrogênio, em todos os complexos, encontram-se muito próximos aos valores teóricos, indicando que os ligantes foram coordenados de forma adequada à estrutura dos complexos.

4.3 Estabilidade em solução dos complexos

A avaliação da estabilidade química dos complexos metálicos em solução é um aspecto fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em ensaios biológicos, especialmente aqueles que envolvem incubação prolongada com células ou biomoléculas. Nesse contexto, a espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foi empregada para monitorar a integridade dos complexos dissolvidos em DMSO em 0, 24 e 48 h, intervalo que espelha o tempo máximo de exposição nos testes in vitro.

A técnica de UV-Vis baseia-se na absorção de radiação eletromagnética por espécies químicas que possuem sistemas eletrônicos conjugados ou centros metálicos que promovem transições eletrônicas, como $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $d-d$ (quando aplicável). Nos complexos metálicos com ligantes aromáticos, como fenantrolinas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas, as bandas observadas no espectro UV-Vis podem ser atribuídas principalmente a

transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ no sistema aromático e, em alguns casos, a transferências de carga do ligante para o metal (TCLM), típicas em complexos de prata(I) com ligantes doadores N e S⁷⁵.

Para o monitoramento, registraram-se espectros em 250–500 nm, e a estabilidade foi inferida pela comparação entre tempos, observando-se:

- manutenção de $\lambda_{\text{máx}}$: (sem deslocamentos batocrômicos ou hipsocrômicos), indicando ambiente eletrônico inalterado;
- conservação do perfil e da absorbância: (sem hipercromismo/hipocromismo e sem alargamento acentuado), sugerindo ausência de decomposição ou agregação;
- ausência de novas bandas: compatível com não formação de subprodutos ou espécies secundárias no período avaliado.

Os espectros registrados para todos os complexos apresentaram perfis espectrais praticamente idênticos nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h. Não foram observadas alterações nos máximos de absorção nem em sua intensidade, como mostrado na FIGURA 21. Esse comportamento indica que os complexos permanecem estáveis em solução de DMSO por pelo menos 48 horas, sem evidências de decomposição ou alteração significativa de estado eletrônico.

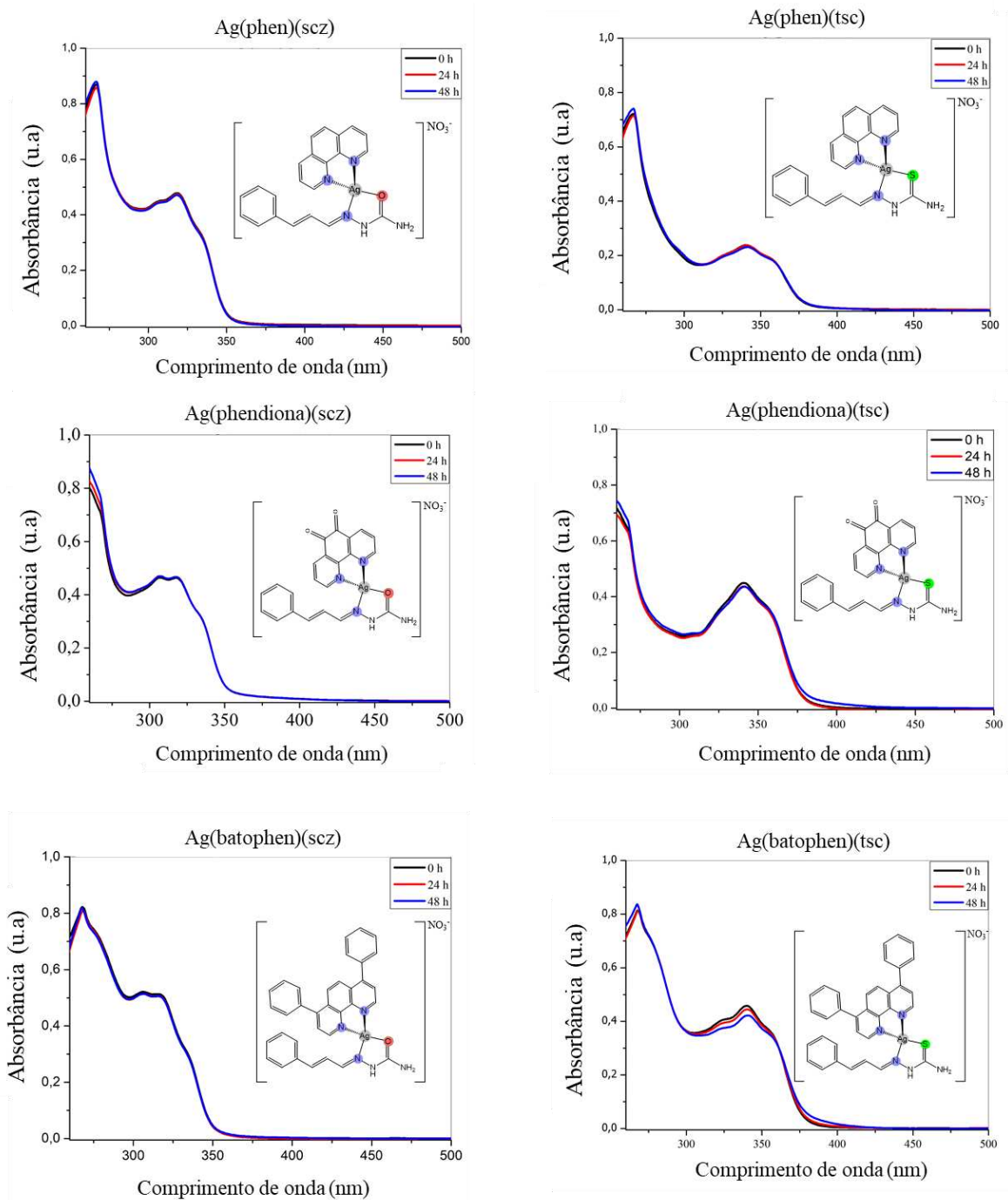


FIGURA 21: Espectro de absorção na região do UV-Vis das soluções dos complexos na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO em 0 h, 24 h e 48 h.

Essa estabilidade pode ser atribuída à alta afinidade dos ligantes fenantrolínicos e semicarbazonas/tiossemicarbazonas pelo centro de prata(I), formando estruturas coordenadas termodinamicamente favorecidas. Além disso, embora o DMSO seja um solvente aprótico e coordenante (S-doador), os dados sugerem ausência de troca significativa de ligantes por DMSO ou decomposição do centro metálico ao longo do tempo monitorado.

Do ponto de vista aplicado, a estabilidade dos complexos em DMSO confere maior credibilidade aos dados obtidos nos ensaios biológicos, uma vez que garante que as interações observadas entre o composto e os sistemas biológicos envolvem a espécie química íntegra. Isso é especialmente relevante para estudos de citotoxicidade, atividade antimicrobiana ou ensaios enzimáticos, nos quais a forma química ativa do complexo deve ser preservada durante o tempo de incubação.

Outra caracterização relevante foi a determinação da condutividade molar (Λ_m) dos complexos em solução de DMSO, na concentração $1,0 \times 10^{-3}$ M à 25 °C, visando avaliar o comportamento eletrolítico em solução e inferir o caráter iônico das espécies. Os valores obtidos estão expressos em $S\ cm^2\ mol^{-1}$ e apresentados na TABELA 5, considerando medições imediatas (0 h) e após 24 h e 48 h do preparo da solução.

TABELA 5: Dados de condutividade molar para as soluções dos complexos em DMSO na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Condutividade molar – $S \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$			
Complexo	0h	24h	48h
[1] $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$	22,40	22,34	22,28
[2] $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{scz})]^+$	29,18	29,10	29,11
[3] $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$	23,35	23,33	23,33
[4] $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	27,25	27,21	27,03
[5] $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{tsc})]^+$	21,88	21,64	21,75
[6] $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$	25,66	25,52	25,93

De modo geral, os valores observados situam-se na faixa de 21,6 a $29,2 S \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, o que é compatível com o comportamento de eletrólitos do tipo 1:1, conforme classificação de Geary⁷⁷. Isso sugere que os complexos apresentam um cátion metálico do tipo $[\text{Ag}(\text{L})(\text{L}')]^+$ acompanhado por um contraíon aniônico livre (NO_3^-), caracterizando espécies catiônicas monovalentes em solução. Ou seja, a condutividade molar indica a presença de um cátion complexo e um ânion em solução por fórmula unitária do sal — comportamento típico de eletrólitos 1:1.

A equação genérica de dissociação eletrolítica pode ser representada da seguinte forma:



Os complexos contendo tiosemicarbazona (tsc) apresentaram, em geral, condutividades ligeiramente menores do que aqueles contendo semicarbazona (scz). Por exemplo, o complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$ apresentou condutividade inicial de $22,40 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, enquanto seu análogo com scz foi de $29,18 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Essa diferença pode estar associada a interações intermoleculares mais fortes promovidas pelos grupos tióis da tiosemicarbazona, ou à maior tendência de formação de pares iônicos, reduzindo a mobilidade iônica efetiva.

A estabilidade das condutividades ao longo de 48 horas indica que as espécies são quimicamente estáveis em solução de DMSO, sem ocorrência significativa de dissociação, reações laterais ou agregação coloidal. Pequenas variações, inferiores a $0,3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, estão dentro da margem experimental esperada para esse tipo de análise.

4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos complexos

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) constitui uma das ferramentas mais poderosas e amplamente utilizadas na elucidação estrutural de compostos orgânicos e organometálicos, permitindo investigar, com alta resolução, os diferentes ambientes químicos de núcleos magneticamente ativos, como ^1H , ^{13}C , ^{15}N , entre outros. Em particular, os núcleos de ^1H e ^{13}C são os mais explorados devido à sua abundância natural e sensibilidade espectroscópica^{74,75}.

Em complexos metálicos, a análise de espectros de RMN pode ser dificultada pela presença de metais paramagnéticos, os quais induzem deslocamentos químicos amplos, alargamento de linhas e supressão de

acoplamentos devido aos elétrons desemparelhados. Por outro lado, em complexos contendo íons diamagnéticos, como Ag(I) (configuração eletrônica [Kr]4d¹⁰), tais efeitos são ausentes, o que permite a obtenção de espectros bem resolvidos. Assim, os deslocamentos químicos observados nos complexos de prata(I) são influenciados principalmente pelo ambiente de coordenação do ligante, possibilitando análises semelhantes às de compostos orgânicos⁷⁶.

Essa característica permite a aplicação eficiente de técnicas unidimensionais (¹H, ¹³C, DEPT) e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC), oferecendo uma análise detalhada de como os ligantes se comportam no ambiente de coordenação. A RMN fornece informações sobre a presença e tipo de núcleos, conectividade entre eles, equivalência química e efeitos eletrônicos induzidos pelo metal, permitindo inferências sobre o ambiente de coordenação, embora a geometria exata do complexo requeira outras técnicas complementares^{74,75}.

Nesta seção, foram aplicadas técnicas de RMN unidimensionais e bidimensionais para a caracterização do complexo [Ag(phendiona)(scz)]⁺. A sequência adotada seguiu uma lógica estrutural: ¹H RMN, ¹³C{¹H} RMN, DEPT-135, HSQC, COSY e HMBC, permitindo a construção progressiva da conectividade dos fragmentos, a atribuição de sinais e a confirmação da estrutura coordenada proposta. A análise integrada dos espectros obtidos revelou dados consistentes e complementares, que serão discutidos nas subseções a seguir. As análises foram realizadas utilizando DMSO-d₆ como solvente deuterado e os espectros foram processados utilizando o software MestReNova. As alterações observadas nos deslocamentos e padrões espectrais corroboram a proposta de estrutura dos complexos obtidos.

4.4.1 Caracterização do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$

A análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 22) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ foi realizada em DMSO-d_6 a 298 K, visando confirmar a coordenação dos ligantes e a integridade estrutural da espécie formada. O espectro revela um conjunto de sinais bem definidos, com deslocamentos químicos característicos dos fragmentos phendiona (1,10-fenantrolina-5,6-diona) e semicarbazona (scz), confirmando a presença dos dois ligantes coordenados à $\text{Ag}(\text{I})$.

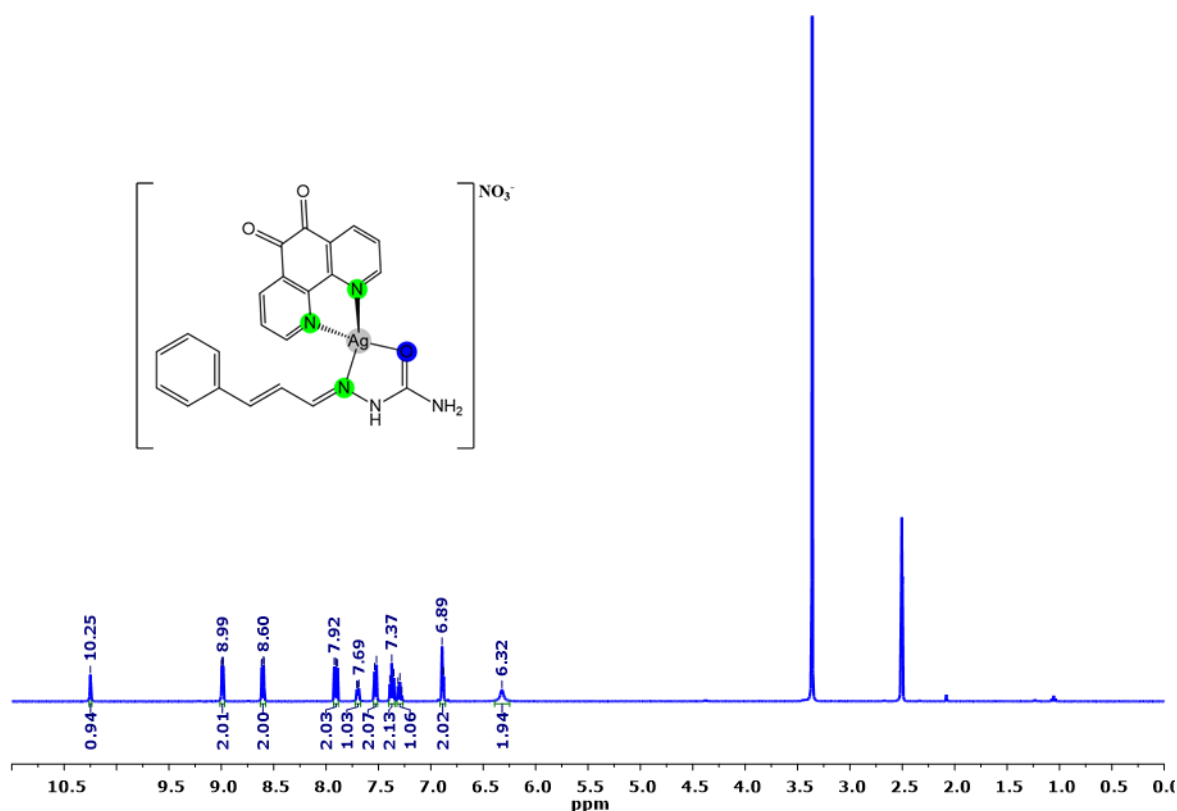


FIGURA 22: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$.

O sinal intenso em 2,50 ppm é atribuído ao solvente DMSO-d₆ e o pico em 3,4 ppm corresponde à água residual presente no solvente deuterado. Esses sinais são esperados e foram desconsiderados na análise das integrais.

O sinal atribuído ao próton imínico (–CH=N–), que aparece como um singleto bem definido em δ 10,20 ppm na semicarbazona livre, sofre um pequeno deslocamento para δ 10,25 ppm após a coordenação ao centro metálico. Embora essa variação seja discreta (+0,05 ppm), ela é consistente com uma ligeira desproteção eletrônica do próton causada pela coordenação do átomo de nitrogênio da imina ao íon Ag(I). A interação com o íon metálico tende a retirar densidade eletrônica do sistema C=N, o que provoca uma leve desblindagem do próton, refletida no deslocamento químico para valores ligeiramente mais baixos de campo magnético.

Na região entre 6,8 e 7,7 ppm, os sinais correspondentes aos prótons aromáticos do anel fenílico da semicarbazona também exibem pequenos deslocamentos e alterações no padrão de multiplicidade. Esses efeitos são atribuídos à redistribuição eletrônica induzida pela coordenação, além de possíveis mudanças conformacionais na cadeia do ligante após sua fixação ao centro metálico.

Para os núcleos de hidrogênio ligados ao nitrogênio terminal da semicarbazona, observa-se um singleto em δ 6,32 ppm, atribuído ao grupo amida (–NH₂). Quando comparado ao espectro do ligante livre, no qual esse sinal aparece em δ 6,28 ppm, nota-se um ligeiro deslocamento para campo mais desprotegido (+0,04 ppm) após a coordenação ao íon Ag(I).

A soma das integrais dos sinais de ¹H atribuídos aos ligantes coincide com o número de hidrogênios esperado para a formulação

monocatiônica $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, corroborando a proposição de um cátion mononuclear 1:1.

Além disso, o padrão de deslocamentos químicos está em concordância com os valores típicos reportados na literatura para ligantes fendiona e semicarbazonas coordenadas a íons metálicos d^{10} , como Ag(I) e Zn(II), corroborando a manutenção do sistema π -conjugado e a estabilização da estrutura por coordenação através dos átomos doadores N.

Não se observam ressonâncias no intervalo alifático de 0,5–4,0 ppm, típico de $\text{CH}/\text{CH}_2/\text{CH}_3$, à exceção dos sinais de água residual ($\sim 3,3$ ppm) e do $\text{DMSO}-d_6$ (2,50 ppm). Essa ausência é compatível com o perfil predominantemente aromático do sistema e indica alta pureza, sem vestígios de impurezas alifáticas, reagentes ou solventes orgânicos residuais.

A espectroscopia de RMN de ^{13}C com desacoplamento de próton ($^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) foi empregada para complementar as atribuições dos sinais observados no espectro de ^1H RMN e fornecer uma visão mais abrangente da constituição estrutural do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$. Essa técnica permite a observação de todos os átomos de carbono da molécula, independentemente de estarem ligados a hidrogênios, sendo, portanto, essencial para a elucidação estrutural completa.

O espectro obtido (FIGURA 23) exibiu 14 sinais distintos, distribuídos no intervalo de 176,9 a 126,1 ppm, valor compatível com o número de carbonos esperados na estrutura coordenada do complexo. Esses sinais confirmam a presença de diferentes ambientes eletrônicos, típicos de carbonos aromáticos, carbonilas e carbonos de ligação dupla conjugados com o sistema aromático da phendiona e da semicarbazona.

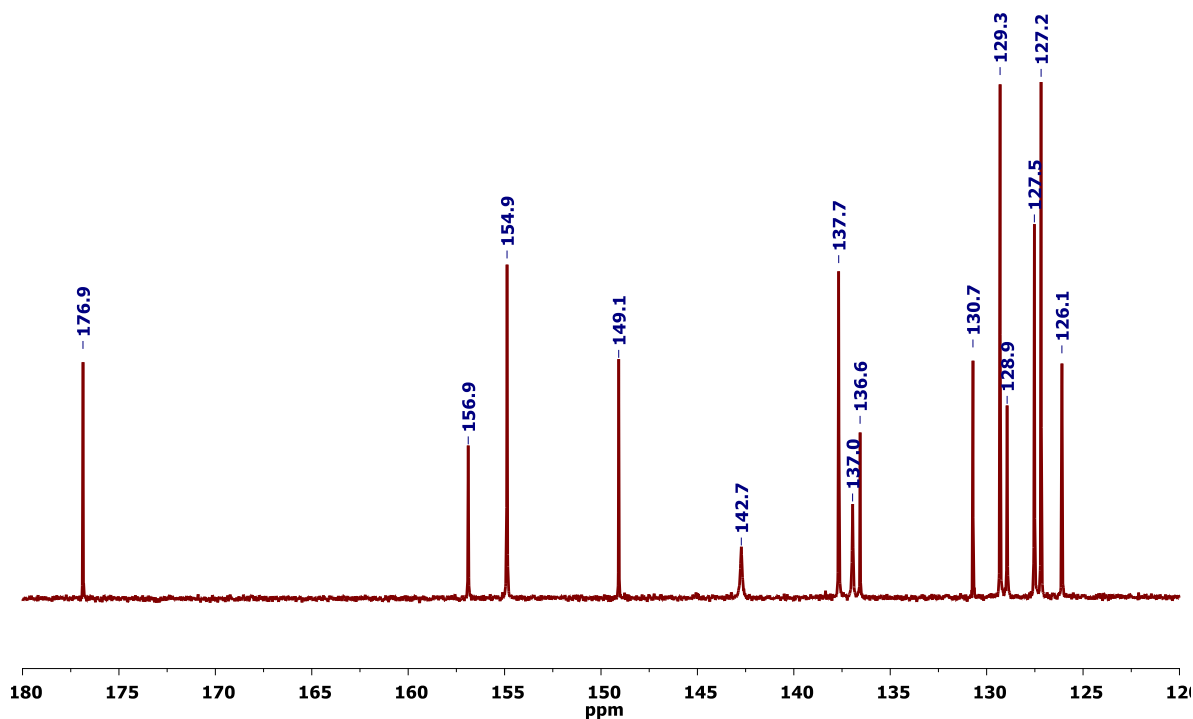


FIGURA 23: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$.

O sinal mais desblindado, em 176,9 ppm, situa-se na região esperada para C=O conjugados, compatível com o quinonoide da phendiona coordenada, sugerindo manutenção do caráter carbonílico após coordenação.

O sinal em 156,9 é atribuído ao carbono C=O amídico da semicarbazona. Em 154,9 ppm é atribuído ao carbono HC=N da phendiona que costuma aparecer com deslocamentos mais alto por estar orto ao átomo de N do anel. Em 149,1 ppm é atribuído ao carbono da porção aromática C-N (piridínico) do anel fenantrolínico, em acordo com a maior desblindagem típica de carbonos ligados a nitrogênio em anéis heteroaromáticos.

O sinal em 142,7 ppm é atribuído ao carbono azometínico ($\text{HC}=\text{N}$) da semicarbazona. Esse deslocamento situa-se acima do intervalo típico CH aromáticos (120-140 ppm) e abaixo das carbonilas (acima de 150 ppm).

As regiões entre 137 e 126 ppm concentram a maioria dos sinais de CH aromáticos, provenientes tanto da phendiona quanto da semicarbazona. A sobreposição de sinais nessa região é comum devido à similaridade dos ambientes eletrônicos dos carbonos aromáticos em sistemas conjugados.

Empregou-se o experimento DEPT-135 para identificar e diferenciar os carbonos ligados a hidrogênio no complexo $[\text{Ag}(\text{phendione})(\text{scz})]^+$. Nesse experimento, os sinais de CH e CH_3 aparecem em fase positiva, os de CH_2 em fase negativa, e carbonos quaternários (sem H diretamente ligado) não são observados.

No espectro (FIGURA 24), foram detectados nove sinais positivos e nenhum sinal negativo, evidenciando a presença de carbonos do tipo CH, e ausência de CH_2 e CH_3 . Este resultado está em concordância com a estrutura esperada do complexo, que não apresenta grupos metil ou metileno.

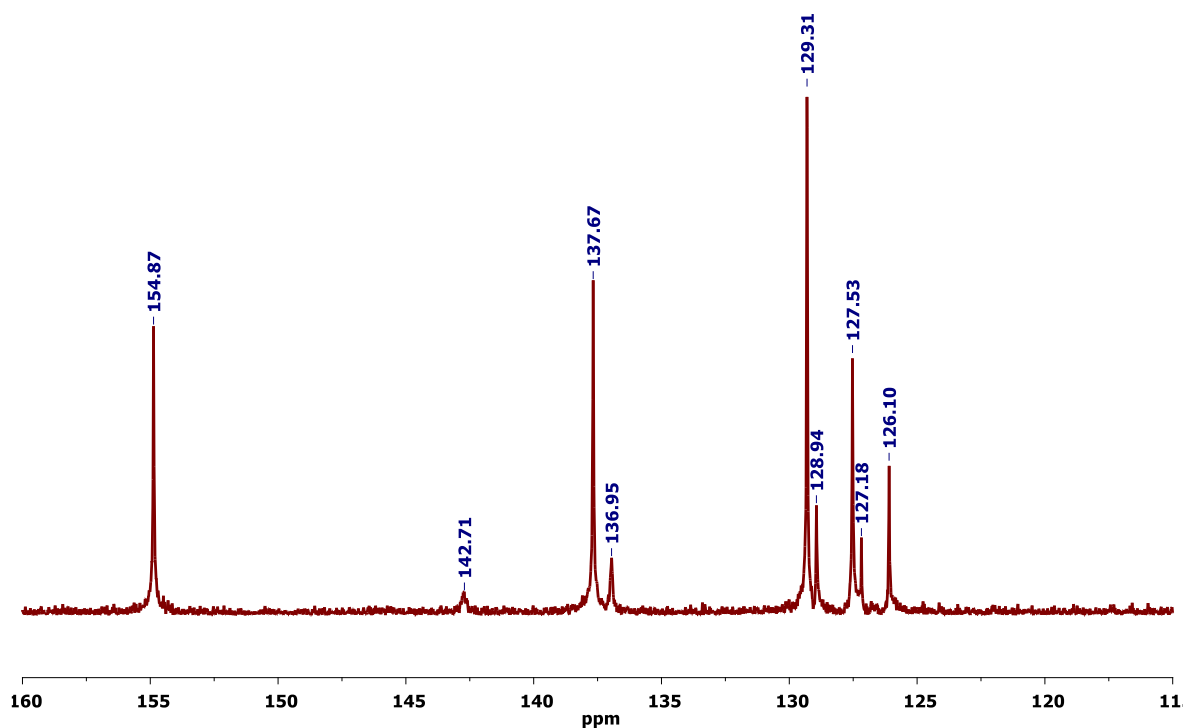


FIGURA 24: Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DEPT-135 (100 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$.

Como esperado, carbonos quaternários aparecem apenas no $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e não no DEPT-135, evidenciando a ausência de sinais, em campo baixo (desblindados), em δ 176,9 ppm ($\text{C}=\text{O}$ quinonoide da phendiona), δ 156,9 ppm ($\text{C}=\text{O}$ amídico da semicarbazona) e δ 149,1 ppm (C aromático ipso-C-N da phendiona). O conjunto $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ + DEPT-135 corrobora a atribuição de quaternários vs. $\text{CH}/\text{CH}_2/\text{CH}_3$, bem como o padrão de hibridização e a distribuição eletrônica dos carbonos no complexo.

A espectroscopia bidimensional COSY (Correlation Spectroscopy) $^1\text{H}-^1\text{H}$ foi empregada com o objetivo de mapear os acoplamentos escalares entre os prótons da estrutura do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, permitindo confirmar as atribuições feitas no espectro unidimensional (^1H) e apoiar a

identificação dos padrões de acoplamento dos sistemas aromáticos e vinílicos do complexo.

No mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (FIGURA 25), os sinais na diagonal correspondem aos deslocamentos químicos dos prótons observados no espectro ^1H convencional. Já os pontos fora da diagonal (cross-peaks) indicam acoplamentos entre pares de prótons vicinais ($^3J_{\text{H-H}}$), revelando conectividade espacial e eletrônica entre eles.

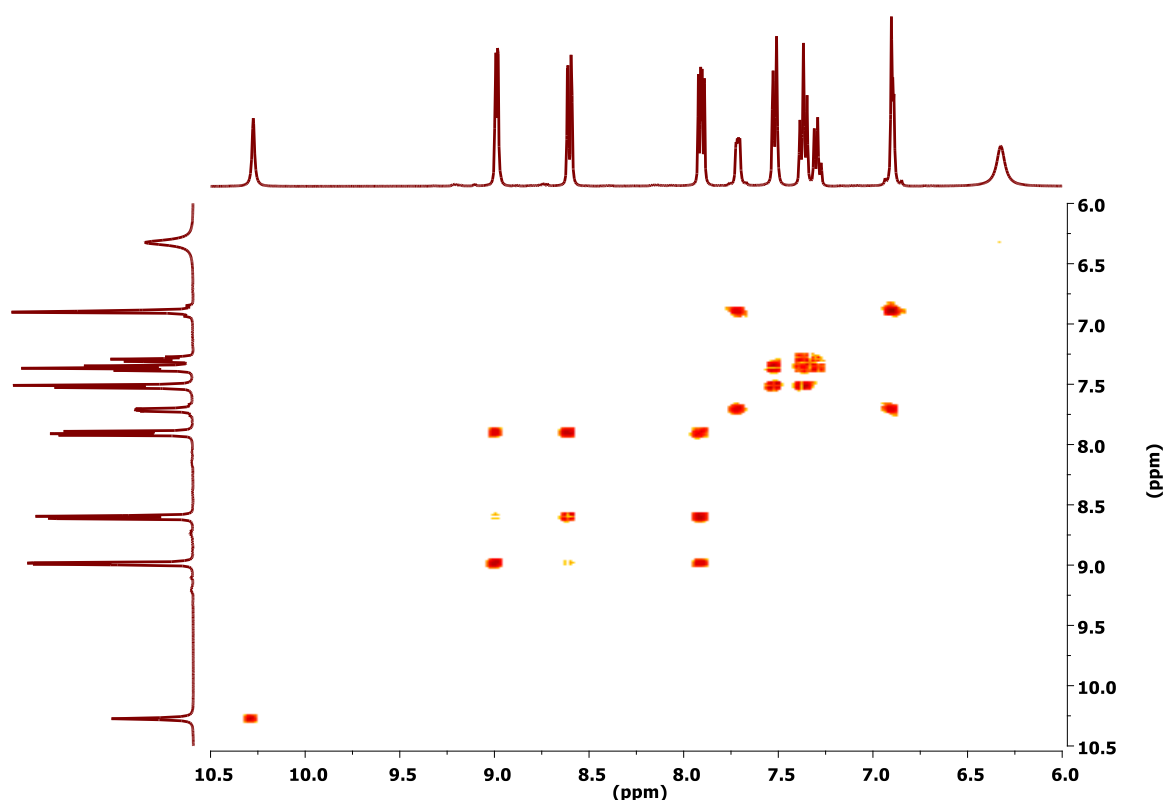


FIGURA 25: Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$.

Um par de correlações bem definidas é observado entre os sinais em 6,80 ppm e 7,00 ppm, consistentes com os dois prótons vinílicos conjugados ($-\text{CH}=\text{CH}-$) da semicarbazona. Entre δ 7,10–7,60 surgem múltiplos cross-

peaks característicos de acoplamentos orto/meta do anel aromático da semicarbazona.

São observadas múltiplas correlações cruzadas entre sinais de δ 8,1-9,2 ppm, consistentes com o padrão de acoplamento típico dos hidrogênios da 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Um sinal isolado na diagonal em 10,25 ppm não apresenta cross-peaks evidentes, o que é coerente com a atribuição ao próton NH amidínico, que geralmente não acopla fortemente com outros prótons devido à rápida troca protônica ou acoplamento fraco.

A espectroscopia bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) é uma técnica de correlação heteronuclear direta que permite observar acoplamentos de um único quantum entre átomos de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) conectados diretamente. Trata-se de uma técnica extremamente útil para a atribuição inequívoca de carbonos ligados a hidrogênios (tipicamente CH, CH_2 e CH_3), oferecendo informações complementares às análises unidimensionais de ^1H e ^{13}C , além de auxiliar na confirmação das estruturas químicas propostas.

Na análise do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, o experimento de HSQC foi fundamental para confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135. No espectro bidimensional (FIGURA 26), foram observadas nove correlações distintas, compatíveis com os nove carbonos do tipo CH presentes na estrutura do complexo. A região de interesse no espectro de HSQC encontra-se entre δ H 6,3–10,3 ppm (eixo horizontal, correspondente ao ^1H) e δ C 120–160 ppm (eixo vertical, correspondente ao ^{13}C intervalo característico de sistemas aromáticos e vinílicos).

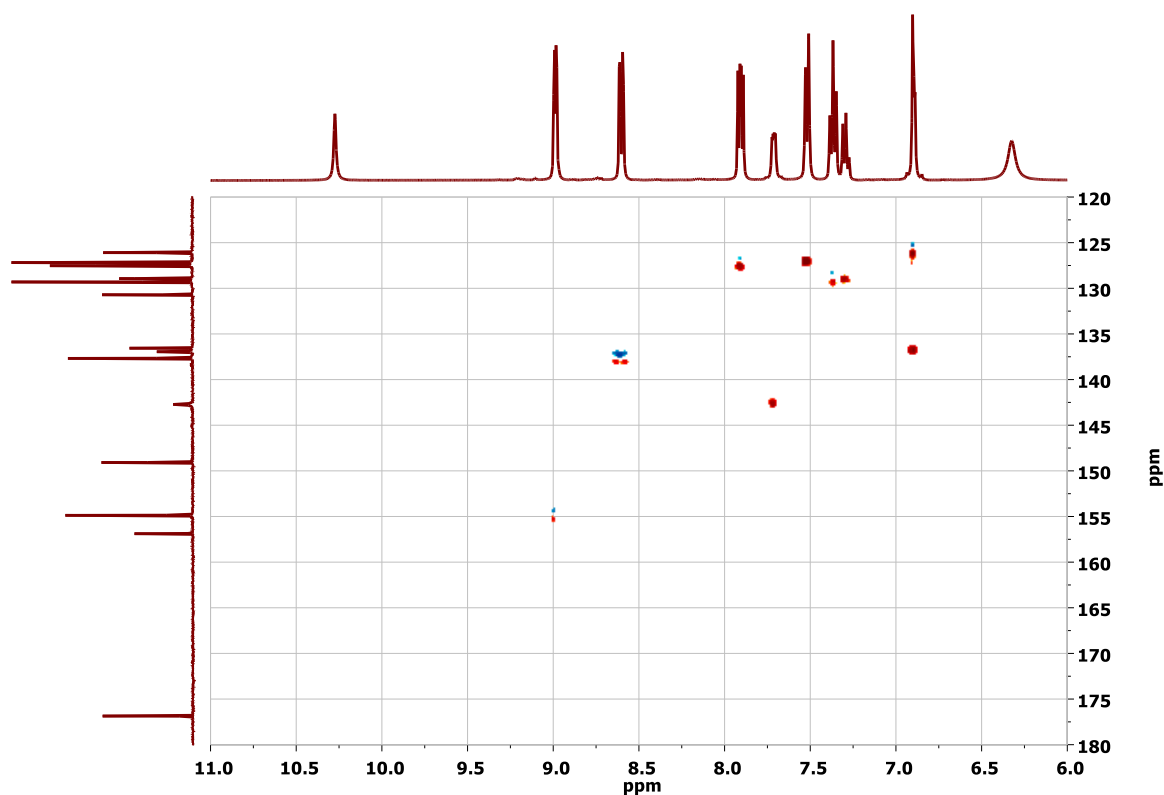


FIGURA 26: Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$.

$\delta\text{H } 7,79 \leftrightarrow \delta\text{C } 142,7$ ppm: carbono azometínico ($\text{HC}=\text{N}$) da semicarbazona.

$\delta\text{H } 8,8\text{--}8,2 \leftrightarrow \delta\text{C } 126\text{--}138$ ppm: conjunto de CH aromáticos da phendiona (padrão orto/meta típico do esqueleto fenantrrolínico).

$\delta\text{H } 7,6\text{--}7,1 \leftrightarrow \delta\text{C } 125\text{--}130$ ppm – CH do anel aromático e prótons vinílicos $\text{--CH}=\text{CH}\text{--}$ da semicarbazona.

Como esperado para sinais sem H diretamente ligado, não se observam correlações para os carbonos quaternários. Portanto, o padrão de correlações é consistente com as atribuições feitas no $^1\text{H}/^{13}\text{C}/\text{DEPT}$.

A técnica de espectroscopia de correlação heteronuclear com múltiplos acoplamentos (HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) é uma ferramenta essencial para a elucidação estrutural de compostos orgânicos e organometálicos. Ao contrário do HSQC, que revela correlações de um único acoplamento (1J C-H), o HMBC identifica interações entre átomos de hidrogênio e carbonos que estão separados por dois a três enlaces covalentes (2J C-H ou 3J C-H), permitindo a observação de ligações cruzadas entre núcleos que não estão diretamente conectados, como H–C–C ou H–C–C=O.

Essa característica torna o HMBC particularmente útil para a atribuição de carbonos quaternários e carbonílicos, que não apresentam hidrogênios diretamente ligados e, por isso, não aparecem no HSQC. A técnica também é valiosa para a determinação de conectividade entre fragmentos e a identificação de centros coordenados ou funcionalizações específicas em estruturas complexas, como no caso de complexos metálicos.

No mapa de contorno HMBC 1H - ^{13}C (FIGURA 27), observa-se correlação do NH amídico (δ H 10,25) com carbonos vizinhos por $^2J/^3J$, incluindo o C=O amídico (δ C 156,9), e carbonos aromáticos, consistente com a conectividade do fragmento azometínico.

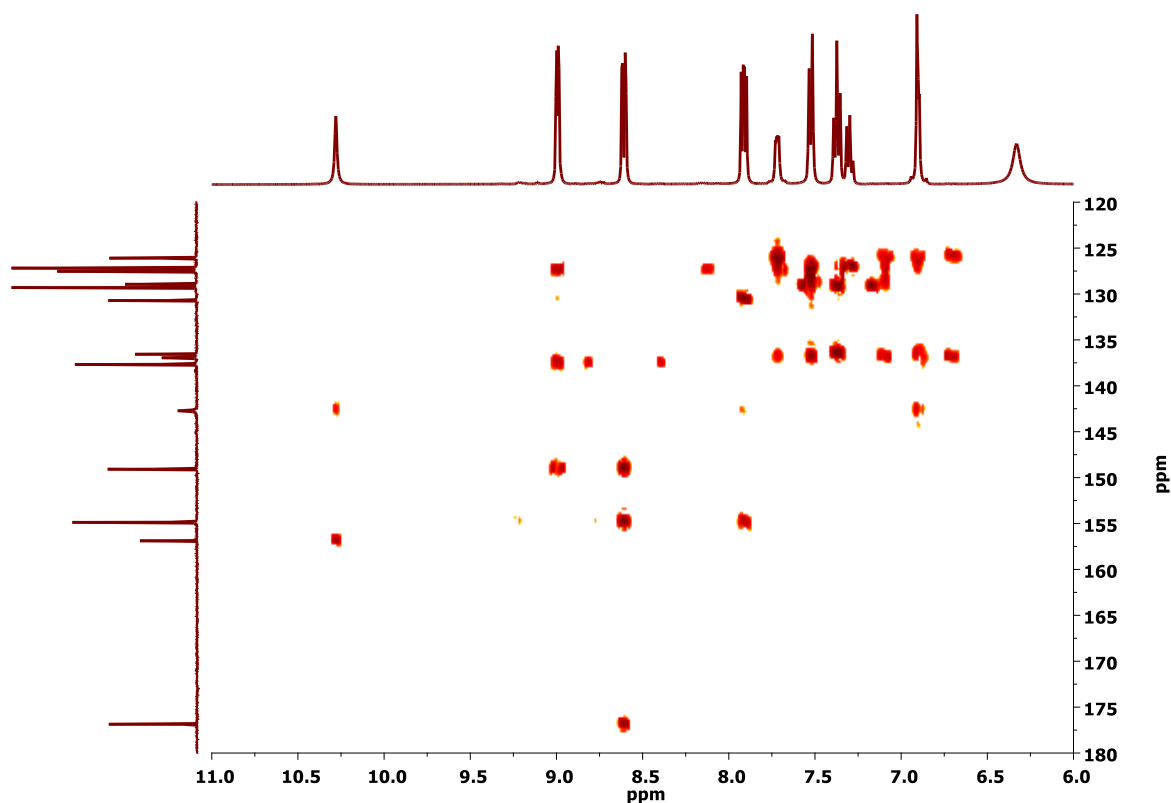


FIGURA 27: Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6) do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$.

A análise do espectro HMBC permitiu validar e complementar as informações obtidas por ^1H , ^{13}C e HSQC, especialmente na atribuição de carbonos quaternários e carbonílicos.

A combinação do HMBC com os demais experimentos de RMN (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT-135 e HSQC) permitiu estabelecer de forma abrangente as conectividades C–H de longo alcance e confirmar as atribuições de carbonos quaternários, resultando em uma elucidação estrutural inequívoca do complexo e corroborando a fidelidade da síntese e a pureza do material isolado.

4.5 Caracterização por espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica poderosa amplamente utilizada na caracterização de compostos inorgânicos e organometálicos, devido à sua capacidade de fornecer informações precisas sobre a massa molecular, composição elementar, fragmentação e, em alguns casos, até sobre a arquitetura estrutural das espécies em solução. A utilização da ionização por electrospray (ESI), em particular, permite a análise de complexos metálicos delicados em condições suaves, favorecendo a detecção de espécies intactas e preservando sua estrutura de coordenação em solução. Dessa forma, a ESI-MS torna-se uma ferramenta complementar essencial às técnicas espectroscópicas e difratométricas na elucidação estrutural de complexos metálicos^{74,75}.

Com o objetivo de investigar o comportamento em solução dos complexos de prata(I), foi realizada a caracterização por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS). No espectro positivo do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$ (FIGURA 28) observa-se um sinal majoritário em $m/z = 522,0147$, atribuído ao íon monocarregado $[\text{M}]^+$ do complexo (o contraíon NO_3^- não é observado). A separação de m/z de 1 unidade entre os picos sucessivos confirma carga $z=1$.

Além do pico principal, observa-se um padrão isotópico característico da prata, com dois picos intensos em $m/z = 522,0147$ e $524,0143$, com diferença de duas unidades de massa e intensidades aproximadamente iguais. Esse padrão é típico da presença dos isótopos naturais ^{107}Ag e ^{109}Ag , que possuem abundâncias relativas próximas (51,8 % e 48,2 %, respectivamente). A boa concordância com o padrão isotópico teórico reforça a atribuição do pico

ao complexo de prata(I). Esses resultados são consistentes com a formulação proposta para o complexo, sugerindo uma estequiometria $[Ag(L)(L')]^+$ em solução, na qual o íon Ag^+ está coordenado a uma molécula de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona) e uma molécula de tiossemicarbazona (tsc).

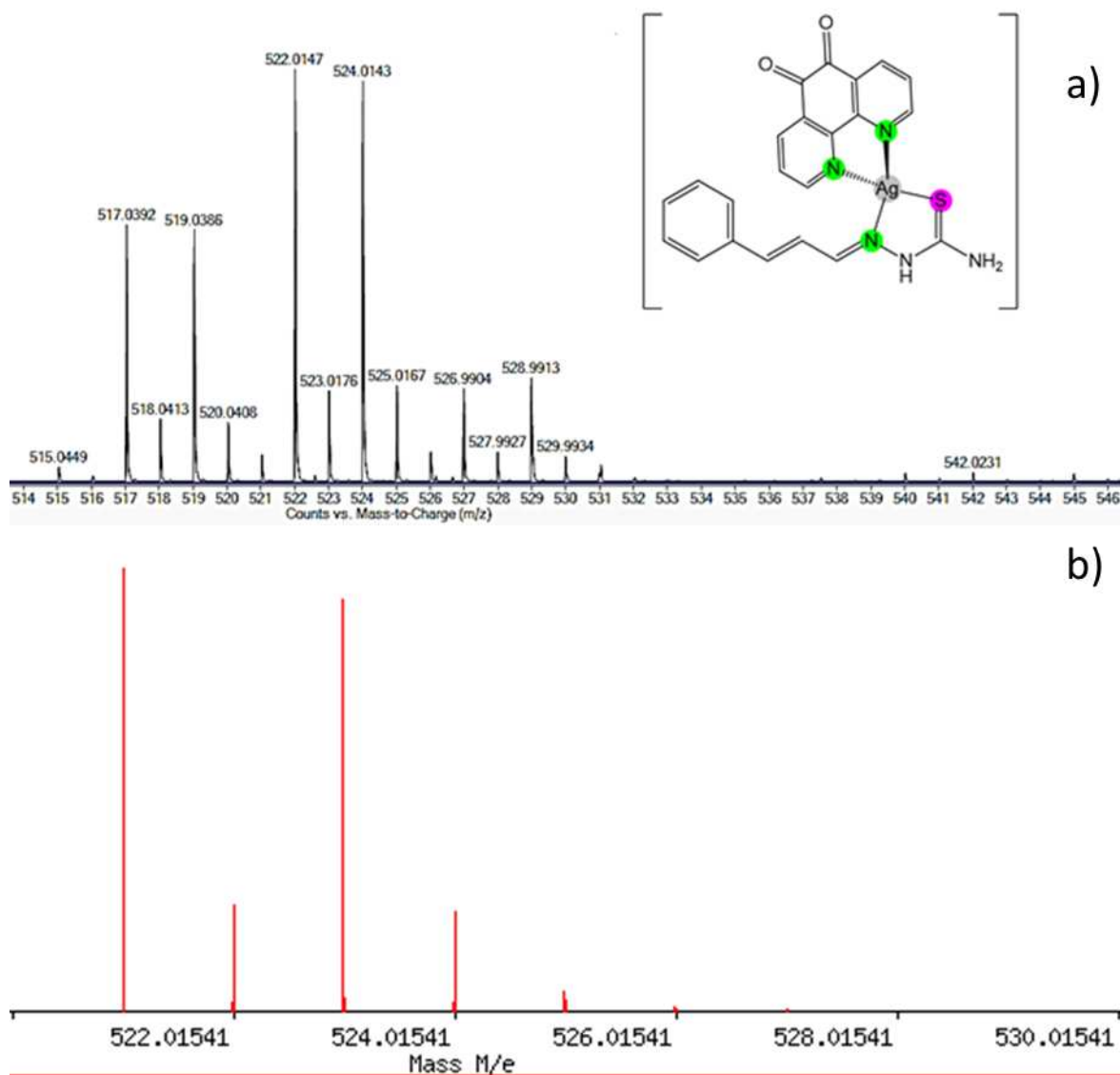


FIGURA 28: Espectro de ESI-MS do complexo $[Ag(phendiona)(tsc)]^+$ (a) Experimental e (b) Teórico.

A TABELA 6 apresenta a comparação entre os valores de razão massa/carga (m/z) teóricos e experimentais obtidos por espectrometria de

massas com ionização por electrospray (ESI-MS) para os complexos de prata(I) sintetizados. A tabela também inclui os erros calculados em partes por milhão (ppm), determinados a partir da diferença entre as massas teóricas esperadas e os valores experimentais observados.

TABELA 6: Comparação das massas teóricas e das massas obtidas por espectrometria de massas (ESI-MS) para os complexos de Ag(I).

Composto	Teórico (m/z)	Experimental (m/z)	Erro (ppm)
Ag(phendiona)(scz)	506,0382	506,0373	1,78 ppm
Ag(phendiona)(tsc)	522,0154	522,0147	1,34 ppm
Ag(batophen)(scz)	628,1267	628,1284	2,71 ppm
Ag(batophen)(tsc)	644,1038	644,1025	2,02 ppm
Ag(phen)(tsc)	492,0412	492,0404	1,62 ppm

De modo geral, os resultados indicam excelente concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos, com erros inferiores a 3 ppm para todos os complexos analisados. Esse nível de precisão é compatível com espectrômetros de alta resolução e reforça a exatidão das fórmulas propostas. A baixa margem de erro constitui um forte indicativo da correta atribuição das espécies detectadas, contribuindo significativamente para a confirmação estrutural dos complexos em solução.

4.6 Ensaio com linhagens celulares: Viabilidade celular (IC₅₀)

Os ensaios citotóxicos e antiproliferativos dos complexos foram conduzidos utilizando o método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), uma técnica amplamente utilizada para avaliação da viabilidade e atividade metabólica celular *in vitro*. Esse método baseia-se na capacidade das enzimas redutoras celulares, particularmente a succinato desidrogenase, de reduzir o sal de tetrazólio MTT em formazanas insolúveis de coloração púrpura. O princípio do ensaio reside no fato de que apenas células metabolicamente ativas são capazes de realizar essa conversão redutiva. Assim, a intensidade da cor formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura após exposição aos compostos testados⁸⁰.

A avaliação da citotoxicidade de compostos frente a diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais é uma etapa fundamental no desenvolvimento de novos candidatos a agentes antineoplásicos. Um dos parâmetros mais relevantes nessa análise é a concentração inibitória média (IC₅₀), definida como a concentração do composto necessária para reduzir a viabilidade celular em 50 %. De forma geral, quanto menor o valor de IC₅₀, maior a potência citotóxica do composto. Além disso, o índice de seletividade (IS) é utilizado para estimar o grau de toxicidade diferencial entre células tumorais e células normais, sendo valores de IS > 4 geralmente considerados desejáveis em termos de seletividade terapêutica. No presente trabalho, foi definido o IS como:

$$IS = MRC-5/IC_{50}(\text{tumoral})$$

Neste estudo, foram avaliadas as linhagens tumorais A2780 (carcinoma de ovário), MDA-MB-231 (câncer de mama triplo-negativo) e

A549 (câncer de pulmão), além da linhagem não tumoral MRC-5 (fibroblastos pulmonares humanos normais). A TABELA 7 apresenta os valores de IC_{50} para os ligantes livres.

TABELA 7: Valores de IC_{50} e índice de seletividade (IS) para os ligantes livres e cisplatina em μM frente a linhagens tumoral e não tumoral no período de 48 h.

IC_{50} (μM) – 48h							
Ligantes	MRC-5	A2780	A549	MDA-MB-231	IS ¹	IS ²	IS ³
Phen	>50	>50	>50	>50	--	--	--
Phendiona	$3,15 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,12$	$0,41 \pm 0,03$	26,25	3,31	7,68
Batophen	$1,66 \pm 0,17$	$0,52 \pm 0,09$	$2,39 \pm 0,09$	$1,58 \pm 0,08$	3,19	0,64	1,05
Tsc	>50	>50	>50	>50	--	--	--
Scz	>50	>50	>50	>50	--	--	--
AgNO ₃	$4,10 \pm 0,63$	$0,75 \pm 0,08$	$11,03 \pm 0,58$	$3,20 \pm 0,24$	5,46	0,37	1,28

IS¹: MRC-5/A2780; IS²: MRC-5/A549; IS³: MRC-5/MDA-MB-231.

A 1,10-fenantrolina (phen), a semicarbazona (scz) e a tiosemicarbazona (tsc) não apresentaram atividade citotóxica significativa até a maior concentração testada (50 μM), indicando que essas moléculas, em sua forma livre, não afetam significativamente a viabilidade celular. Isso sugere que a coordenação ao centro metálico pode ser essencial para a ativação biológica

desses ligantes. Além disso, a ausência de citotoxicidade das hidrazonas (scz e tsc) aponta para uma baixa toxicidade intrínseca, o que é desejável para fragmentos de ligantes em compostos mais seletivos.

A phendiona foi o ligante mais potente, com IC_{50} de 0,12 μM (A2780), 0,41 μM (MDA-MB-231) e 0,95 μM (A549). Em células normais (MRC-5), o valor de IC_{50} foi de 3,15 μM , o que resultou em altos índices de seletividade: $IS^1 = 26,25$ (A2780), $IS^2 = 3,31$ (A549) e $IS^3 = 7,68$ (MDA-MB-231). Esses resultados indicam que phendiona tem atividade citotóxica intrínseca, com boa seletividade, especialmente para a linhagem ovariana A2780. A presença dos grupos ceto nas posições 5 e 6 da fenantrolina pode contribuir para interações adicionais com alvos biológicos, como enzimas redox e DNA, além de aumentar a polaridade e reatividade nucleofílica da molécula, o que pode explicar sua superior atividade em relação à phen⁸¹.

Batophen, com grupos fenila nas posições 4 e 7, também apresentou atividade relevante, com IC_{50} de 0,52 μM (A2780), 1,58 μM (MDA-MB-231) e 2,39 μM (A549). O valor em MRC-5 foi de 1,66 μM , resultando em $IS^1 = 3,19$ (A2780), $IS^2 = 0,64$ (A549) e $IS^3 = 1,05$ (MDA-MB-231). Embora menos seletivo que phendiona, batophen ainda mostra potencial citotóxico considerável. A presença dos anéis aromáticos adicionais pode aumentar a lipofilicidade do composto, favorecendo a inserção em membranas celulares e possíveis interações intercalantes com DNA, justificando sua maior toxicidade em relação à phen.

Ao ser coordenada ao íon prata(I) e a hidrazonas, como nos complexos $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ e $[Ag(phendiona)(tsc)]^+$, o IC_{50} frente à

mesma linhagem aumentou levemente para 0,31 μM e 0,25 μM , respectivamente, conforme mostrado na Tabela 8.

TABELA 8: Valores de IC_{50} e índice de seletividade (IS) para os complexos em μM , frente as linhagens tumoral e não tumoral em 48 h.

Complexos	A2780	MDA-MB-231	A549	MRC-5	IS ¹	IS ²	IS ³
[Ag(phen)(scz)] ⁺	1,51 $\pm$ 0,09	2,42 $\pm$ 0,52	5,44 $\pm$ 0,30	2,74 $\pm$ 0,09	1,81	0,50	1,13
[Ag(phen)(tsc)] ⁺	1,47 $\pm$ 0,35	4,21 $\pm$ 0,10	5,35 $\pm$ 0,11	3,23 $\pm$ 0,03	2,19	0,60	0,77
[Ag(phendiona)(scz)] ⁺	0,31 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,05	2,04 $\pm$ 0,02	1,33 $\pm$ 0,30	4,29	0,65	7,39
[Ag(phendiona)(tsc)] ⁺	0,25 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,09	2,08 $\pm$ 0,05	1,74 $\pm$ 0,17	6,96	0,84	5,27
[Ag(batophen)(scz)] ⁺	0,25 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 0,12	1,51 $\pm$ 0,08	6,04	1,05	2,49
[Ag(batophen)(tsc)] ⁺	0,29 $\pm$ 0,01	1,93 $\pm$ 0,45	2,68 $\pm$ 0,07	2,35 $\pm$ 0,15	8,10	0,88	1,22

IS¹: MRC-5/A2780; IS²: MRC-5/A549; IS³: MRC-5/MDA-MB-231.

Esse comportamento sugere que, embora a coordenação não tenha potencializado a atividade antiproliferativa da phendiona, os complexos mantiveram um perfil bastante ativo, provavelmente devido à contribuição conjunta do centro metálico e das hidrazonas. A leve diminuição da atividade pode estar relacionada a alterações na disponibilidade dos grupos ceto da phendiona, importantes para interação com alvos celulares, ou à diferença de lipofilicidade e permeabilidade celular induzida pela complexação⁸².

A batophen livre também exibiu boa atividade ($\text{IC}_{50} = 0,52 \mu\text{M}$ em A2780), e seus complexos com hidrazonas, como [Ag(batophen)(scz)]⁺ e

[Ag(batophen)(tsc)]⁺, apresentaram IC₅₀ ainda mais baixos (0,25 e 0,29 µM em A2780, respectivamente). A presença dos grupos fenila aumenta a lipofilicidade do ligante, facilitando a entrada na célula e possíveis interações intercalantes com o DNA. A coordenação ao metal potencializa esse efeito, resultando em complexos mais potentes.

Tanto a semicarbazona quanto a tiossemicarbazona mostraram-se biologicamente inativas na forma livre (IC₅₀ > 50 µM). No entanto, ao serem coordenadas com os ligantes fenantrolínicos e prata(I), os complexos formados se tornaram biologicamente ativos. Isso demonstra que essas hidrazonas atuam como ligantes auxiliares que, embora não ativos por si só, desempenham papel essencial na estabilização do complexo e possivelmente na sua interação tridimensional com biomoléculas, modulando a orientação espacial e a solubilidade dos complexos.

Além disso, diferenças sutis entre os complexos contendo scz vs. tsc sugerem que a natureza da hidrazona influencia levemente a atividade dos complexos. Em alguns casos, a scz promoveu maior potência ou seletividade, enquanto em outros, a tsc resultou em maior efeito citotóxico.

De modo geral, os complexos sintetizados apresentaram elevada atividade citotóxica, com valores de IC₅₀ na faixa de 0,25 a 5,44 µmol L⁻¹, inferiores aos da cisplatina, utilizada como fármaco padrão e que apresenta IC₅₀ em torno de 11,5 µmol L⁻¹ (A2780) e 12,43 µmol L⁻¹ (MDA-MB-231).

Os resultados indicam que a coordenação a Ag(I) preserva e, em alguns casos, modestamente amplia a atividade dos ligantes aromáticos ativos (p.ex., phendiona e batophen), ao mesmo tempo em que pode “ativar” ligantes pouco ativos (SCZ/TSC), conferindo-lhes funcionalidade biológica. Nessa

perspectiva, os complexos $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$ despontam como candidatos promissores para estudos mecanísticos avançados e avaliação *in vivo*, combinando potência citotóxica, seletividade (IS) e estabilidade química sob as condições testadas. A TABELA 9 resume os IC_{50} e o impacto da coordenação a Ag(I) na citotoxicidade e seletividade frente às linhagens tumorais, em comparação com a célula não tumoral MRC-5.

TABELA 9: Considerações gerais e principais destaques dos ligantes e dos complexos frente às linhagens tumorais e não tumorais.

Destaque	Observação
Ligantes scz/tsc	Inativos isoladamente ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$), tornam-se ativos após coordenação a Ag(I).
Phendiona (ligante livre)	Já ativa; alguns complexos mantiveram ou até melhoraram a potência (ex: $0,18 \mu\text{M}$ em MDA-MB-231).
Coordenação com Ag(I)	Em geral, promove sinergia e aumenta atividade citotóxica, especialmente frente a MDA-MB-231 e A2780.
$[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	Um dos complexos mais seletivos e potentes (IS = 7,39 frente a MDA-MB-231).
$[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$	Também apresenta atividade submicromolar com bom IS em MDA-MB-231.

4.7 Avaliação da atividade antiproliferativa e efeitos morfológicos em células tumorais

4.7.1 Ensaio clonogênico: impacto do complexo na sobrevivência a longo prazo

O ensaio de sobrevivência clonogênica, também denominado ensaio de formação de colônias, é amplamente utilizado para avaliar a capacidade de uma única célula sobreviver a uma agressão química ou física e manter sua capacidade proliferativa a longo prazo, originando colônias compostas por 50 ou mais células. Trata-se de uma metodologia sensível que permite determinar os efeitos citotóxicos ou citostáticos prolongados de agentes químicos, como fármacos e compostos experimentais, por meio da quantificação da fração de células viáveis que retêm a capacidade de proliferação após o tratamento⁸³.

Esse ensaio é especialmente relevante para a avaliação da eficácia de agentes antitumorais, uma vez que detecta não apenas a morte celular direta, mas também fenômenos como a paralisação do ciclo celular, senescência e morte mitótica, os quais não são identificados por métodos convencionais de viabilidade de curto prazo, como MTT, XTT ou exclusão por azul de tripano. O ensaio clonogênico é considerado o “padrão-ouro” na análise de sobrevivência celular, justamente por incorporar todos esses mecanismos de resposta ao estresse celular, refletindo de forma mais fidedigna a capacidade de regeneração da população celular após o dano induzido⁸⁵.

Dessa forma, o ensaio de formação de colônias representa uma ferramenta essencial na caracterização da citotoxicidade e no estudo do

potencial terapêutico de novos compostos, sendo amplamente aplicado em pesquisas pré-clínicas, especialmente no contexto oncológico.

O ensaio clonogênico foi realizado para o complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ na linhagem MDA-MB-231, quantificando-se o número e a área das colônias 10 dias após a exposição. As concentrações testadas foram definidas a partir do IC_{50} previamente determinado ($1/4 \times \text{IC}_{50}$; $1/2 \times \text{IC}_{50}$; $1 \times \text{IC}_{50}$). A FIGURA 29 evidencia redução dose-dependente da clonogenicidade, com queda acentuada em $1/2 \times \text{IC}_{50}$ consistente com efeito citotóxico e/ou citostático do complexo sobre as células MDA-MB-231.

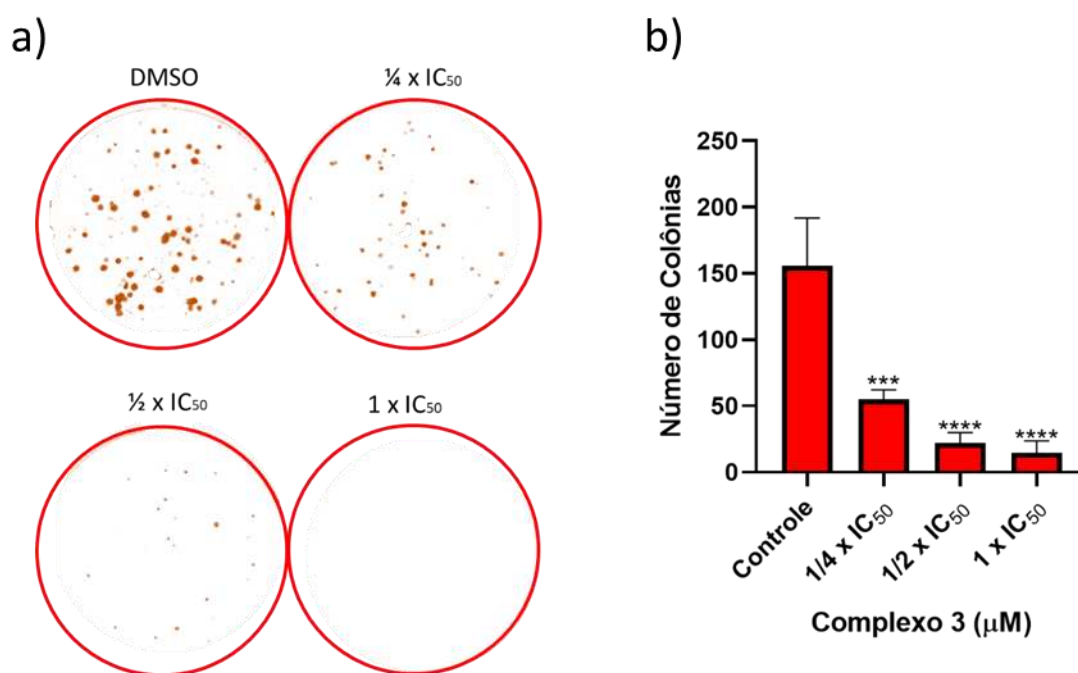


FIGURA 29: A) imagens representativas das colônias de MDA-MB-231 após 10 dias nas condições: controle DMSO; $1/4 \times \text{IC}_{50}$, $1/2 \times \text{IC}_{50}$ e $1 \times \text{IC}_{50}$ do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$. B) distribuição do número de colônias para cada concentração. A análise estatística foi realizada com one-way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett (*** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).

No painel da esquerda (A), observa-se claramente que: o grupo controle (DMSO) apresenta um número elevado de colônias, com tamanhos variados, indicando uma alta capacidade proliferativa das células MDA-MB-231.

Com o aumento da concentração do composto (tratamento):

- Há uma redução progressiva do número de colônias.
- A concentração intermediária ($\frac{1}{2}$ IC₅₀) já demonstra uma redução acentuada, mas ainda com presença de algumas colônias residuais.
- Na concentração equivalente ao IC₅₀, praticamente não há formação de colônias visíveis, evidenciando perda de clonogenicidade.

O gráfico (painel B) mostra a quantificação do número de colônias para cada condição experimental. Os dados revelam:

- Redução significativa na capacidade clonogênica já a partir de $\frac{1}{4}$ IC₅₀, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (**p < 0,001).
- Na concentração correspondente ao IC₅₀ e $\frac{1}{2}$ IC₅₀, a capacidade de formação de colônias é praticamente abolida, com significância ainda maior (***p < 0,0001), sugerindo forte ação antiproliferativa do composto testado.

Em conjunto, os dados indicam supressão robusta da capacidade clonogênica (morte reprodutiva) de MDA-MB-231 de forma dependente da dose, compatível com efeitos citotóxicos e/ou citostáticos de longo prazo.

Embora o clonogênico não discrimine o mecanismo, o padrão observado reforça dano proliferativo duradouro e o potencial terapêutico do complexo em células de fenótipo agressivo.

4.7.2 Análise morfológica celular: alterações morfológicas em curto prazo

A avaliação morfológica por microscopia em campo claro é uma ferramenta essencial na caracterização da atividade citotóxica de novos compostos bioativos, especialmente no contexto do desenvolvimento de agentes antitumorais. Essa técnica permite observar diretamente alterações estruturais nas células que ocorrem em resposta ao tratamento, fornecendo informações qualitativas que complementam os ensaios quantitativos de viabilidade celular, como MTT.

As alterações morfológicas observadas, como arredondamento celular, retração do corpo celular, vacuolização, perda de aderência e desintegração da membrana plasmática, são frequentemente associadas a processos de morte celular por apoptose ou necrose, podendo indicar o início de estresse oxidativo ou disfunções mitocondriais. Assim, o monitoramento da morfologia celular ao longo do tempo e sob diferentes concentrações do composto testado fornece uma visão abrangente do seu perfil de toxicidade⁸⁶⁻⁸⁸.

Na FIGURA 30 são apresentadas as micrografias obtidas para as células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com o complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ nas concentrações correspondentes a $1\times$, $2\times$ e $4\times$ IC_{50} , nos tempos de incubação de 0 h, 24 h e 48 h. A organização da imagem permite comparar diretamente o efeito do tratamento de forma dependente da dose e do tempo.

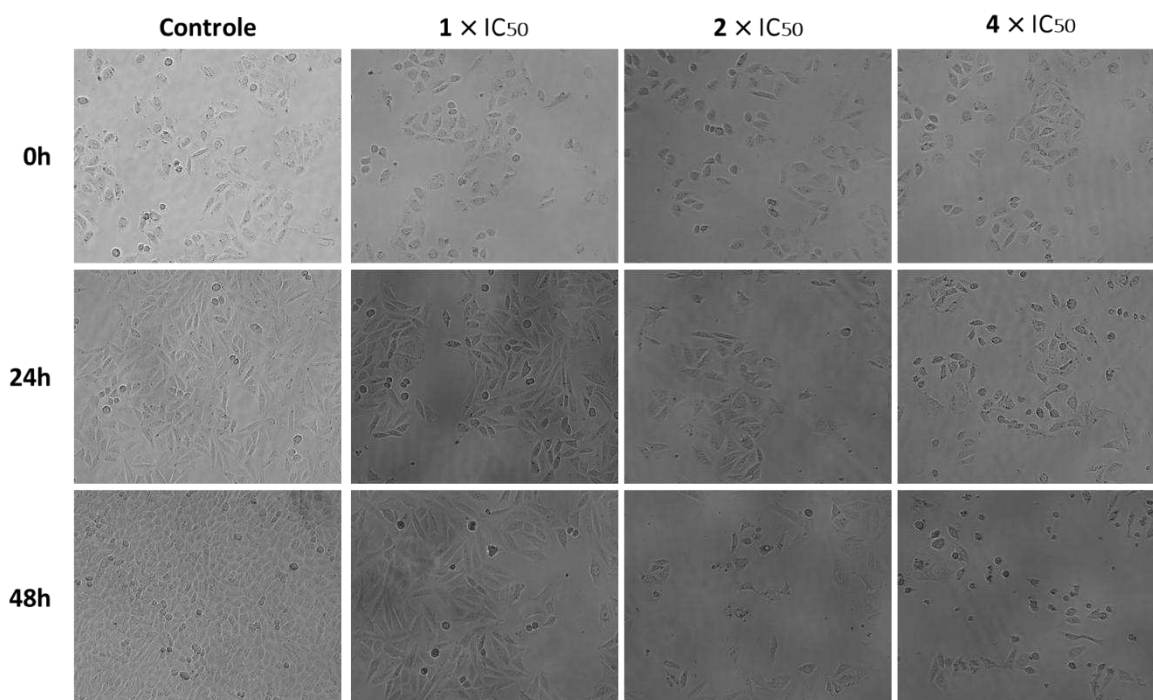


FIGURA 30: Micrografias em campo claro de MDA-MB-231 tratadas com $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ nas concentrações $1 \times IC_{50}$, $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ por 0, 24 e 48 h. Colunas: Controle (DMSO), $1 \times$, $2 \times$ e $4 \times IC_{50}$. Linhas: 0 h, 24 h e 48 h. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.

No tempo 0 h, todas as amostras apresentavam morfologia alongada e fusiforme característica das células MDA-MB-231 aderidas, indicando condições basais homogêneas entre os grupos. Após 24 h de incubação, o grupo controle manteve a morfologia e a confluência celular, enquanto nos grupos tratados foi possível observar alterações progressivas. No grupo $1 \times IC_{50}$, algumas células começaram a perder a aderência e adotar uma forma mais arredondada, sinalizando estresse celular inicial. Nas condições $2 \times$ e $4 \times IC_{50}$ induziram redução acentuada da confluência, arredondamento e perda de adesão com presença de detritos celulares, alterações compatíveis com perda de viabilidade e morte celular.

Após 48 h, o efeito citotóxico do complexo foi ainda mais pronunciado. O grupo controle manteve-se morfológicamente íntegro e com alta densidade celular. No grupo $1 \times IC_{50}$, houve leve redução da confluência, e algumas células apresentavam sinais de apoptose. Nos grupos $2 \times$ e $4 \times IC_{50}$, a maioria das células já havia perdido a aderência, apresentando-se arredondadas ou em suspensão, com fragmentação celular visível, condizente com morte celular avançada⁸².

Esses resultados reforçam o perfil citotóxico do complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$, demonstrando que sua ação é dependente da dose e do tempo de exposição. A progressiva alteração na morfologia celular, observada já nas primeiras 24 h, é consistente com os dados obtidos em ensaios de viabilidade e aponta para um possível mecanismo de ação envolvendo indução de apoptose.

Com o objetivo de complementar a análise em campo claro e caracterizar alterações estruturais associadas à citotoxicidade, foram realizadas marcações fluorescentes em MDA-MB-231 tratadas com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ (FIGURA 32). Utilizou-se Green Plasma™ (marcação citoplasmática/contorno celular, canal verde; $\lambda_{exc} = 522$ nm; $\lambda_{em} = 535$ nm) e DAPI (marcação nuclear, canal azul; $\lambda_{exc} = 358$ nm; $\lambda_{em} = 461$ nm). A combinação permite avaliar, de forma qualitativa, integridade e organização do citoplasma e morfologia nuclear, dois indicadores sensíveis de estresse e perda de viabilidade celular. É importante notar que a morfologia por fluorescência não define sozinha o tipo de morte celular, devendo ser interpretada em conjunto com marcadores ortogonais, conforme diretrizes amplamente aceitas para monitoramento de morte celular^{86,87}.

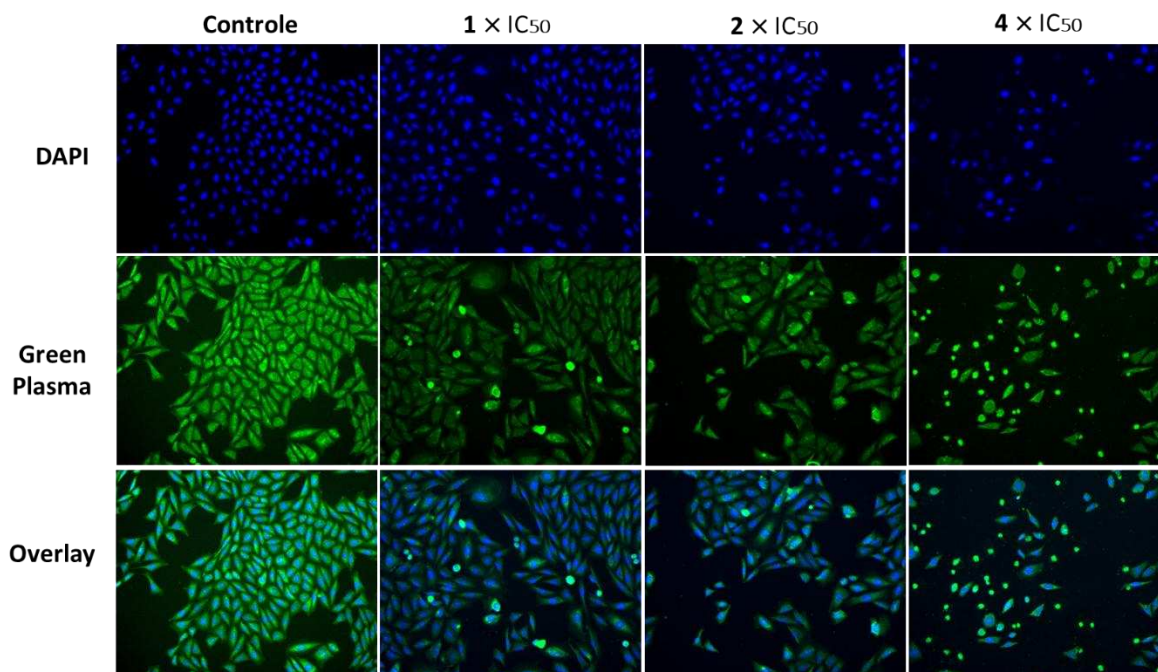


FIGURA 31: Ensaio morfológico por fluorescência, células MDA-MB-231 tratadas com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ e marcadas com Green Plasma (verde) $\lambda_{exc} = 522 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ e DAPI (azul) $\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$. Condições: Controle (DMSO), 1 $\times$, 2 $\times$ e 4 $\times$ IC₅₀ por 48 h. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.

Nas imagens de fluorescência, as células controle (DMSO) exibem morfologia fusiforme, com citoplasma bem definido (verde intenso e uniforme) e núcleos regulares e homogêneos (DAPI). A sobreposição das duas colorações mostra células bem organizadas e com alta confluência, compatível com células viáveis e proliferativas.

Após o tratamento com a concentração equivalente à IC₅₀ por 48 h, observa-se redução da densidade celular e alterações discretas na morfologia: algumas células apresentam núcleos mais condensados e citoplasma retraído, sugerindo o início de um processo apoptótico. Ainda assim, muitas células

mantêm integridade morfológica, como também evidenciado na imagem em luz branca.

Em $2\times IC_{50}$ as alterações tornam-se marcantes: (i) núcleos picnóticos e/ou fragmentados (aumento de intensidade e pontilhamento no canal DAPI, compatíveis com condensação e cariorréxis), (ii) citoplasma retraído/desorganizado (redução da área verde contínua e contornos irregulares) e (iii) queda evidente da confluência. Conjunto altamente sugestivo de morte celular com predominância de eventos apoptóticos em parte da população, embora o mecanismo específico requeira confirmação bioquímica.

Os sinais de toxicidade tornam-se marcantes em $4\times IC_{50}$. Nessa condição, observa-se perda de adesão celular, condensação e fragmentação nuclear (sinal de DAPI intenso e pontual) e sinal verde (CellMask™ Green) difuso ou ausente em muitas células, sugerindo desorganização citoplasmática. O conjunto morfológico é compatível com morte celular avançada, consistente com apoptose tardia/necrose secundária, em concordância com um efeito dependente da dose do complexo. Os padrões de fluorescência descritos são coerentes com a redução da clonogenicidade. A supressão da formação de colônias ($1/2$ e $1\times IC_{50}$) e a perda ampla de viabilidade ($2\times$ e $4\times IC_{50}$) aparecem aqui como condensação/fragmentação nuclear, retração citoplasmática e desaderência. Em $1\times IC_{50}$, a presença de células ainda aderentes após 48 h explica-se pelo fato de que a morfologia reflete o dano imediato, enquanto o clonogênico mede a capacidade de replicação de longo prazo; assim, células morfolologicamente “viáveis” podem já estar comprometidas de forma irreversível e incapazes de formar colônias. Em conjunto, os dados reforçam o perfil antiproliferativo e citotóxico dependente de dose do $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ em MDA-MB-231.

4.8 Avaliação da Atividade Antitumoral em Modelo 3D (Esferoides Tumoriais)

Modelos tridimensionais (3D), como os esferoides multicelulares tumorais, oferecem uma representação mais fiel do microambiente tumoral *in vivo*, ao mimetizar características fisiológicas relevantes, como gradientes de oxigênio, nutrientes e pH, além de promover resistência à penetração de agentes quimioterápicos. Tais modelos permitem uma avaliação mais robusta da atividade antiproliferativa, toxicidade e penetração de novos compostos em comparação aos sistemas bidimensionais.

Neste estudo, esferoides formados a partir da linhagem MDA-MB-231, um modelo de câncer de mama triplo-negativo altamente invasivo e resistente foram tratados com concentrações crescentes do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, sendo avaliados por até 144 h quanto à morfologia, integridade estrutural e indícios de viabilidade celular. A FIGURA 32 ilustra a resposta morfológica dos esferoides ao tratamento, de forma dependente da concentração.

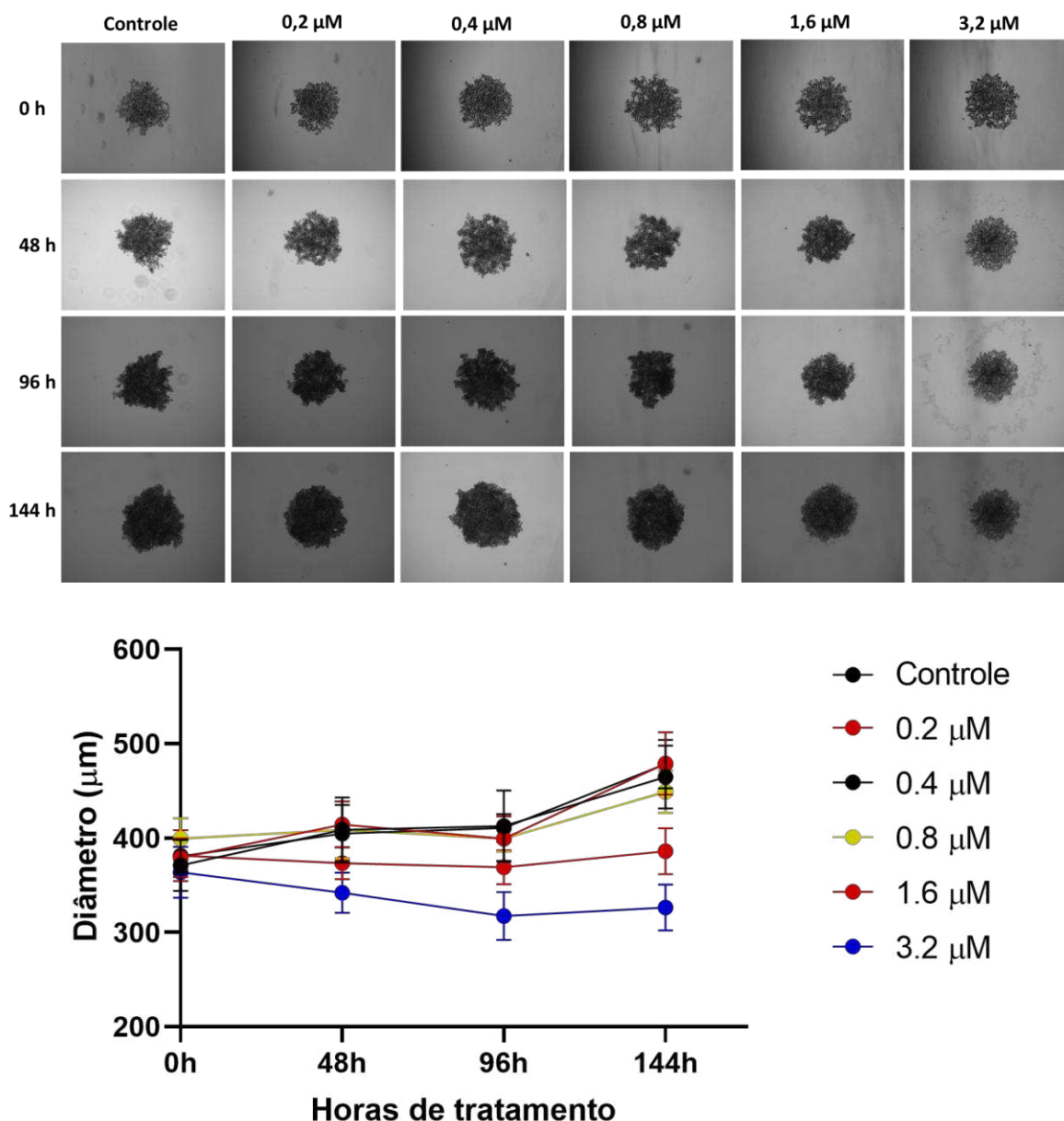


FIGURA 32: A) Crescimento dos esferoides para a linhagem celular MDA-MB-231 tratada com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ variando-se tempo e concentração e B) Gráficos dos diâmetros dos esferoides pelo tempo de tratamento. Imagens obtidas com microscópio CELENA®

É importante destacar que a concentração de IC_{50} determinada em modelo 2D para a linhagem MDA-MB-231 foi de 0,18 μM , o que indica que o

composto apresenta elevada potência antiproliferativa. No modelo 3D, a manutenção da estrutura dos esferoides até 0,4 μM evidencia a maior resistência ao ambiente tridimensional, que envolve barreiras físicas à difusão do composto e diferenciação fenotípica das células tumorais.

A partir de 0,8 μM , cerca de 4x o IC_{50} , os efeitos citotóxicos tornam-se visivelmente significativos, o que demonstra que, apesar da maior resistência do modelo 3D, o composto mantém atividade relevante. Já em 1,6 μM e 3,2 μM , os esferoides apresentam colapso estrutural completo, o que indica eficácia do composto mesmo em microambientes tumorais mais complexos.

Definimos colapso estrutural como perda $\geq 50\%$ da área projetada (ou do diâmetro) em relação a 24 h e/ou fragmentação do contorno. Nessas condições, o colapso aparece com consistência em 1,6 e 3,2 μM , entre 96 e 144 h, iniciando-se por ruptura do anel proliferativo periférico, cavitação/clareamento central e fragmentação do agregado.

Esses resultados reforçam a atividade dose-dependente do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ e sustentam seu potencial como agente antitumoral promissor frente a tumores agressivos e quimiorresistentes, como os tumores de mama triplo-negativo, inclusive em modelos tridimensionais, que se aproximam mais das condições fisiológicas *in vivo*.

Com o objetivo de aprofundar a análise dos efeitos citotóxicos do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ sobre a linhagem MDA-MB-231 cultivada em modelo 3D, foi realizada coloração fluorescente com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e PI (iodeto de propídio) após 144 h de tratamento. A DAPI permite a marcação de núcleos celulares viáveis e não viáveis, enquanto o PI penetra

apenas em células com membranas comprometidas, sinalizando células mortas por necrose ou apoptose em estágio avançado. A FIGURA 33 mostra as imagens obtidas por microscopia de fluorescência, organizadas por concentração do composto.

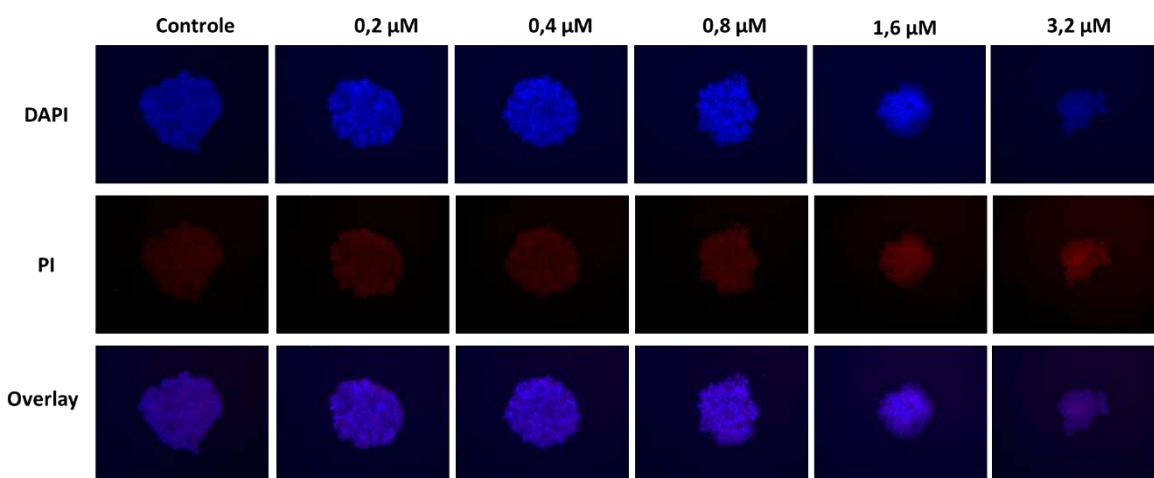


FIGURA 33: Marcações dos esferoides com DAPI e PI da linhagem celular MDA-MB-231 tratada com o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ após 144 horas.

- Controle e baixas concentrações (0,2 e 0,4 μM): intensa fluorescência azul (DAPI), com núcleos bem definidos e ausência significativa de fluorescência vermelha (PI). Isso indica alta viabilidade celular e manutenção da integridade de membrana, confirmando que nestas concentrações o composto não induziu morte celular significativa, em concordância com a análise morfológica.

- Concentração intermediária (0,8 μM): aumento discreto na fluorescência vermelha, indicando início da permeabilização de membranas celulares e presença de células em morte. Corresponde ao ponto de transição observado na morfologia, onde começa a ocorrer desorganização esferoidal.

- Concentrações elevadas (1,6 e 3,2 μM): fluorescência vermelha intensa (PI), associada a redução da fluorescência azul e fragmentação nuclear, sugerindo que a maior parte das células se encontram-se mortas, com perda de integridade de membrana plasmática.

A marcação com DAPI/PI confirmou os dados morfológicos observados previamente, evidenciando que o composto $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ induz morte celular dose-dependente em esferoides da linhagem MDA-MB-231. A partir de 0,8 μM já é possível observar efeitos citotóxicos relevantes, os quais se intensificam de forma significativa em 1,6 e 3,2 μM , onde há perda estrutural e aumento marcante na positividade para PI.

Esses resultados reforçam a ação antitumoral do composto, inclusive frente a um modelo tridimensional mais próximo do microambiente tumoral real, demonstrando potencial para penetração e indução de morte celular efetiva mesmo em camadas internas dos esferoides. A discrepância entre a concentração efetiva no modelo tridimensional e o valor de IC_{50} obtido em cultura 2D (0,18 μM) é esperada, dado que os esferoides apresentam maior resistência ao tratamento devido a barreiras físicas de penetração, gradientes de oxigênio e nutrição, além de diferenças fenotípicas e genéticas induzidas pela arquitetura 3D. De fato, diversos estudos demonstram que a concentração necessária para induzir efeitos citotóxicos visíveis em modelos 3D pode ser 2 a 10 vezes maior em comparação a culturas planas⁸⁹⁻⁹¹. Ainda assim, a resposta observada a partir de 0,8 μM demonstra que o complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ mantém sua eficácia mesmo em um ambiente tridimensional mais desafiador.

4.9 Atividade Anti-Leishmania

O presente trabalho adota uma abordagem exploratória: avaliamos *in vitro* a atividade de complexos de prata(I) com ligantes derivados de fenantrolina (incluindo phendiona e batophen) e (tio)semicarbazonas, inicialmente em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, como estratégia de triagem de potência (EC_{50}), paralelamente à citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 (IC_{50}) para estimar índice de seletividade ($IS = IC_{50}/EC_{50}$). Os complexos contendo os ligantes fenantrolina (phen), phendiona e batophen, em combinação com semicarbazonas (scz) ou tiossemicarbazonas (tsc), apresentaram diferentes níveis de atividade antiparasitária e seletividade. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 10.

TABELA 10: Valores de EC_{50} (μM) para promastigotas de Leishmania, IC_{50} (μM) em macrófagos RAW 264.7 e índice de seletividade (IS).

Complexo	EC_{50} (L. amazonensis)	EC_{50} (L. braziliensis)	IC_{50} (RAW 264.7)	IS (L.a / L.b)
$[Ag(phen)(scz)]^+$	$5,6 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$	14,9	2,7 / 5,1
$[Ag(phen)(tsc)]^+$	$6,0 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,6$	4,0	0,7 / 1,5
$[Ag(phendiona)(scz)]^+$	$0,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,3$	2,3	11,5 / 4,6
$[Ag(phendiona)(tsc)]^+$	$0,2 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	1,6	8,0 / 4,0
$[Ag(batophen)(scz)]^+$	$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	3,8	12,7 / 9,5
$[Ag(batophen)(tsc)]^+$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	2,7	9,0 / 9,0

Os complexos contendo fenantrolinas substituídas mostraram clara superioridade em relação ao sistema com phen simples. Os complexos da phendiona e batophen tanto com a semicarbazona quanto a tiossemicarbazona

apresentaram os menores valores de EC_{50} frente às duas espécies de *Leishmania*, atingindo submicromolaridade ($< 0,5 \mu M$). Este resultado pode ser atribuído a:

- Maior caráter lipofílico (batophen com grupos fenila): favorece a penetração na membrana do parasita. Esses grupos aromáticos apolares aumentam a afinidade do complexo pelo ambiente lipídico, facilitando sua penetração através da bicamada lipídica da membrana do parasita *Leishmania*. Consequentemente, os complexos com batophen apresentam maior capacidade de atravessar a membrana celular e atingir seu alvo intracelular.

- Presença de grupos carbonila na phendiona: A phendiona (1,10-fenantrolina-5,6-diona) contém grupos carbonila conjugados no anel fenantrolínico, que conferem características redox ao ligante. Essas carbonilas formam um sistema quinonoide capaz de participar de reações redox reversíveis, favorecendo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente intracelular. As ROS são conhecidas por causar danos oxidativos a biomoléculas essenciais do parasita, como DNA, proteínas e lipídeos, comprometendo sua viabilidade

- Interação sinérgica entre prata(I) e ligantes N,O/N,S: A prata(I) apresenta alta afinidade por ligantes contendo átomos doadores como nitrogênio, oxigênio e enxofre, o que permite a formação de complexos estáveis com ligantes do tipo semicarbazona e tiossemicarbazona. Essa coordenação favorece a geração de espécies químicas citotóxicas intracelulares que podem interagir com biomoléculas vitais do parasita, incluindo proteínas com grupos tiol, DNA e componentes da membrana. A sinergia entre a prata(I) e os ligantes

aumenta a seletividade e a eficácia antileishmania, potencializando os efeitos individuais de cada componente.

O complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{scz})]^+$ também mostrou atividade razoável ($\text{EC}_{50} \sim 5,6 \mu\text{M}$), porém com menor seletividade em comparação a phendiona e batophen. Já o $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$ apresentou um IS abaixo de 1, o que indica citotoxicidade relevante frente a células hospedeiras, com baixa seletividade.

De forma consistente, os complexos com semicarbazonas (scz) apresentaram valores de SI superiores aos respectivos tiosemicarbazonas (tsc) em praticamente todos os casos, indicando uma maior seletividade e menor toxicidade para células de mamífero.

Isso pode ser atribuído ao fato de que as tiosemicarbazonas possuem maior lipofilicidade, o que pode favorecer a internalização nos macrófagos, mas também pode contribuir para citotoxicidade mais acentuada, especialmente em compostos não seletivos.

Os complexos $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$, $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{tsc})]^+$ mostraram excelente potência e índices de seletividade adequados ($\text{IS} > 4$), o que os torna candidatos promissores a agentes antileishmaniais. Estes compostos combinam:

- Alta atividade antiparasitária ($\text{EC}_{50} < 0,5 \mu\text{M}$)
- Baixa toxicidade em macrófagos ($\text{IC}_{50} > 1,5 \mu\text{M}$)
- IS entre 8 e 12,7, que está dentro do intervalo considerado

promissor para fármacos antiparasitários.

Esses dados reforçam o potencial dos complexos de Ag(I) coordenados a ligantes doadores N,O e N,S como protótipos promissores para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários. A presença de grupos aromáticos volumosos (batophen) ou carbonilas redox-ativas (phendiona) demonstrou ser determinante para o aumento da atividade biológica e da seletividade.

As atividades observadas são comparáveis ou superiores a fármacos de referência como miltefosina e anfotericina B (com EC_{50} em torno de 0,5 a 2 μ M para promastigotas), o que posiciona esses compostos como fortes candidatos a continuidade nos ensaios com amastigotas intracelulares e modelos *in vivo*.

4.10 Atividade antibacteriana

4.10.1 Atividade qualitativa

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem se tornado um dos principais desafios de saúde pública mundial. Nesse contexto, a busca por novos compostos com potencial antimicrobiano tem se intensificado, sendo os complexos metálicos uma das classes mais promissoras. Compostos de prata, em particular, têm atraído atenção devido à sua conhecida atividade antimicrobiana de amplo espectro, atribuída à liberação de íons Ag^+ e à sua capacidade de interagir com proteínas, DNA e membranas bacterianas, promovendo disfunção celular¹⁶⁻²⁰.

Para uma avaliação inicial da atividade antimicrobiana dos complexos sintetizados, foi conduzido um ensaio qualitativo de difusão em ágar, no qual se mensurou o diâmetro dos halos de inibição formados ao redor

dos poços contendo os compostos. O ensaio foi realizado contra duas cepas bacterianas clinicamente relevantes: *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa). Foram avaliados seis complexos de prata(I), cada um contendo um ligante fenantrolínico (phen, phendiona ou batophen) em combinação com uma semicarbazona (scz) ou tiossemicarbazona (tsc). A ciprofloxacina foi utilizada como controle positivo e DMSO como controle negativo. Os compostos foram aplicados a uma concentração fixa de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

TABELA 11: Halo de inibição dos complexos nas cepas de *K.Pneumoniae* e *S.Aureus*

	<i>K.Pneumoniae</i>	<i>S.Aureus</i>
Ag(phendiona)(scz)	16 mm	20 mm
Ag(phendiona)(tsc)	14 mm	18 mm
Ag(phen)(scz)	12 mm	14 mm
Ag(phen)(tsc)	12 mm	13 mm
Ag(batophen)(scz)	14 mm	16 mm
Ag(batophen)(tsc)	14 mm	14 mm

*resultados determinados segundo o critério de valor de halo de inibição bruto > 10 mm.⁸

De acordo com os critérios adotados (halos de inibição > 10 mm indicam atividade)⁸, todos os compostos testados apresentaram atividade

antibacteriana positiva contra ambas as cepas. No entanto, os halos de inibição variaram em tamanho, sugerindo diferenças na eficácia dos complexos de acordo com a estrutura do ligante.

Os complexos contendo phendiona como ligante fenantrolínico apresentaram os maiores halos de inibição, especialmente frente a *S. aureus*. Esse desempenho pode estar relacionado ao motivo 5,6-diona (quinonoide) da phendiona, cujos grupos carbonila modulam eletronicamente o anel fenantrolínico e o centro Ag(I), aceitam ligações de hidrogênio e conferem caráter redox (potencial para geração/transferência de ROS), favorecendo interações com alvos bacterianos. Além disso, a maior polaridade do motivo diona pode favorecer a difusão no ágar, contribuindo para halos mais amplos (sem necessariamente implicar maior potência intrínseca).

A substituição (scz e tsc) não alterou substancialmente a atividade em disco, mas em alguns casos os complexos com scz exibiram halos ligeiramente maiores, resultado compatível com a maior solubilidade/menor lipofilicidade de scz em relação a tsc, o que costuma aumentar a difusão radial em ágar.

Embora os dados obtidos confirmem a atividade antibacteriana qualitativa dos complexos sintetizados, eles ainda são considerados preliminares. Assim, ensaios quantitativos, como a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), tornam-se indispensáveis para uma avaliação mais precisa da eficácia antimicrobiana, além de possibilitar comparações diretas entre os compostos quanto à potência e espectro de ação.

4.10.2 Atividade quantitativa

A avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados frente a cepas bacterianas clínicas demonstrou um perfil promissor, especialmente para os complexos de Ag(I) contendo fenantrolinas substituídas. A TABELA 12 resume os valores de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os compostos frente as cepas bacterianas testadas.

TABELA 12: Valores de Concentração Inibitória Mínima para os compostos e complexos metálicos de Ag(I) em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Compostos	Bactérias			
	E.Coli	S.Epidermidis	K.pneumoniae	S.aureus
Phen	>500	>500	>500	125
Phendiona	62,5	31,2	62,5	15,6
Batophen	125	62,5	125	31,5
[Ag(phen)(scz)] ⁺	>500	250	>500	125
[Ag(phen)(tsc)] ⁺	>500	250	>500	125
[Ag(phendiona)(scz)] ⁺	12,5	3,12	6,25	1,56
[Ag(phendiona)(tsc)] ⁺	25	3,12	6,25	1,56

$[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$	31,25	31,2	62,5	15,6
$[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{tsc})]^+$	31,25	15,6	62,5	7,8

A 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendiona), mesmo em sua forma livre, demonstrou boa atividade antimicrobiana, com MICs de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e $31,25 - 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para outras cepas. No entanto, a complexação com Ag(I) levou a um efeito sinérgico evidente, sobretudo no complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, que apresentou atividade notavelmente superior com valores de MIC de $1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus*, $3,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. epidermidis*, $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *K. pneumoniae* e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*.

Comparativamente, o ligante livre phen foi menos ativo, com MICs elevados ou superiores a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em várias cepas, sugerindo baixa eficácia intrínseca. Entretanto, ao ser coordenada ao centro metálico de prata, a atividade antimicrobiana foi significativamente aumentada, evidenciando que a complexação não apenas estabiliza a molécula, como também potencializa seu efeito biológico.

O complexo $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$ também apresentou melhora na atividade frente às cepas Gram-positivas, embora de forma menos expressiva quando comparado ao derivado com phendiona, indicando que a substituição na fenantrolina influencia diretamente na capacidade de permeação e interação com a célula bacteriana. O batophen possui grupos alquila volumosos que podem afetar sua solubilidade ou penetração celular, justificando sua atividade mais modesta (MIC de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *K. pneumoniae*).

Outro ponto relevante a ser destacado nos resultados é o padrão diferencial de susceptibilidade entre cepas Gram-positivas e Gram-negativas frente aos complexos testados. Observou-se que as bactérias Gram-positivas, representadas por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, foram mais susceptíveis à ação dos complexos, apresentando valores de MIC significativamente menores em comparação com as Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*).

Essa diferença de sensibilidade pode ser explicada com base nas características estruturais da parede celular bacteriana. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa adicional, composta por uma bicamada lipídica rica em lipopolissacarídeos (LPS), que funciona como uma barreira protetora seletiva, dificultando a entrada de compostos hidrofílicos, metalofármacos e moléculas de maior tamanho ou carga. Além disso, essa membrana contém porinas seletivas, que regulam o transporte de substâncias para o interior da célula, restringindo ainda mais a permeabilidade a compostos exógenos, como os complexos metálicos.

Por outro lado, as Gram-positivas não possuem essa membrana externa e apresentam uma parede celular mais espessa, composta principalmente por camadas de peptidoglicano, mas com maior permeabilidade a agentes antimicrobianos. Essa característica torna as Gram-positivas mais vulneráveis à ação de complexos metálicos, que conseguem penetrar mais facilmente e interagir com alvos intracelulares, como o DNA, proteínas essenciais ou a membrana citoplasmática.

Esse padrão é coerente com a literatura, que demonstra que muitos compostos metálicos e complexos de prata(I), embora eficazes contra ambos os

tipos bacterianos, frequentemente apresentam atividade aumentada contra cepas Gram-positivas devido à barreira física imposta pelas Gram-negativas

Em comparação com fármacos padrão como a ciprofloxacina, que usualmente apresenta MICs na faixa de $0,25 - 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli*, os complexos de Ag(I), especialmente $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, demonstram-se bastante eficazes, com valores de MIC próximos ou até abaixo dos padrões estabelecidos para novos candidatos antibacterianos ($<4 \mu\text{g mL}^{-1}$).

TABELA 13: Comparação dos Valores de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre Complexos de Ag(I) e Antibióticos Padrão

Composto / Antibiótico	MIC – <i>S. aureus</i>	MIC – <i>E. coli</i>
$[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$	1,95	15,6
$[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$	7,81	31,25
$[\text{Ag}(\text{phen})(\text{scz})]^+$	125	>500
Ciprofloxacina	0,25 – 1	0,015 – 0,5
Gentamicina	1 – 4	0,5 – 4
Vancomicina	0,5 – 2	>64
Eritromicina	0,25 – 2	>64
Cefotaxima	0,5 – 8	0,5 – 4

Portanto, os complexos, em especial $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$, mostraram atividade comparável a antibióticos clínicos importantes frente a bactérias Gram-positivas, com destaque para *S. aureus*. Embora os valores contra Gram-negativas ainda sejam superiores aos de fluoroquinolonas (como a ciprofloxacina), os resultados indicam um potencial terapêutico real, que justifica a continuação dos estudos em ensaios de CIM₅₀, CMB (concentração bactericida mínima), toxicidade e mecanismos de ação.

4.11 Interação com DNA: titulação espectroscópica com *ct*-DNA

A espectrofotometria na região do UV-Vis é uma técnica amplamente empregada na caracterização da interação entre pequenas moléculas bioativas e ácidos nucleicos. Quando um composto interage com o DNA, especialmente por intercalação ou inserção em sulcos (groove binding), podem ser observadas alterações espectrais como hipocromismo, deslocamento batocrômico (red shift), ou, menos frequentemente, hipercromismo, indicando mudanças no ambiente eletrônico do cromóforo devido à ligação com o DNA.^{92,93}

Para investigar a interação do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{scz})]^+$ com DNA, foi realizada uma titulação espectrofotométrica utilizando *ct*-DNA (DNA de timo de bezerro), como ilustrado na FIGURA 34.

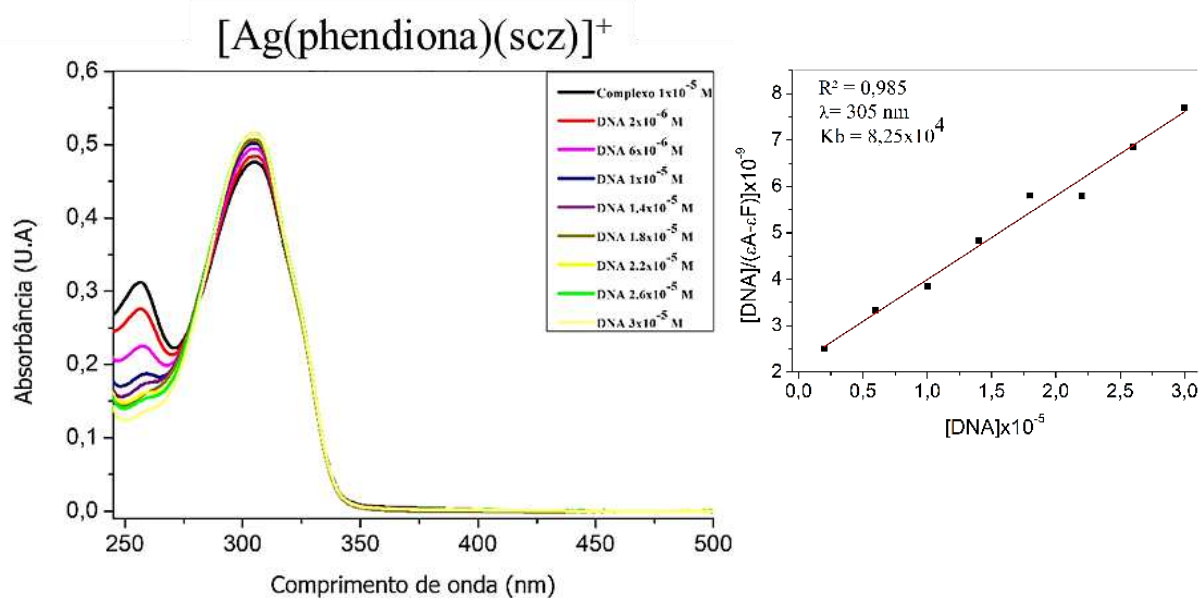


FIGURA 34: Interação com o DNA via UV-Vis em concentração fixa do complexo e variações crescentes da concentração de *ct*-DNA.

A análise quantitativa da afinidade foi realizada com base na equação de Benesi–Hildebrand, utilizando os valores de absorbância obtidos a 305 nm. A curva linear correspondente está representada na Figura 34, e apresentou excelente correlação linear ($R^2 = 0,985$). A constante de ligação (K_b) obtida foi de $8,25 \times 10^4$ M, valor que caracteriza uma interação de afinidade moderada, inferior à de intercaladores clássicos como a doxorubicina ($K_b \sim 10^6$ M), e mais compatível com modos de ligação superficiais ou não invasivos ao empilhamento de bases.

Este valor de constante de ligação é:

I. Superior ao observado para a fenantrolina não substituída (phen), que tipicamente apresenta K_b entre 10^3 e 10^4 mol⁻¹ L, sugerindo que a presença dos grupos carbonila da phendiona e da hidrazona favorece a interação;

II. Semelhante a valores reportados para complexos metálicos intercalantes moderados, como $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ ou $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, cujos K_b situam-se na faixa de 10^4 a 10^5 mol⁻¹ L;

III. Inferior ao de intercaladores clássicos como a doxorubicina ($K_b \sim 10^6$ mol⁻¹ L), que promovem profundas alterações conformacionais na estrutura do DNA.

Considerando também a ausência de deslocamentos batocrômicos expressivos no espectro UV-Vis e o padrão observado em gel de eletroforese com pUC19, conclui-se que os complexos interagem com o DNA possivelmente por meio de interações eletrostáticas com o esqueleto fosfato e, em menor grau, por ligação em sulco (groove binding). Não há indícios robustos de intercalação clássica sob as condições avaliadas.

4.12 Interação com DNA: interação com plasmídeo superenovelado

A investigação da interação entre compostos e DNA é uma etapa fundamental na avaliação do potencial farmacológico de candidatos a fármacos, especialmente em compostos com atividade antitumoral ou antimicrobiana. Um dos métodos mais utilizados para esse fim é o ensaio de mobilidade eletroforética com plasmídeo superenovelado, que permite observar alterações conformacionais na molécula de DNA a partir da sua migração em gel de agarose.⁹⁴

O DNA plasmidial superenovelado (forma covalentemente fechada circular) apresenta estrutura compacta e alta densidade topológica, o que permite sua migração rápida através da matriz de agarose. Quando um composto interage com o DNA, especialmente por ligação covalente, intercalante ou por indução de quebras ou relaxamento da estrutura helicoidal, a conformação do plasmídeo pode ser alterada, levando à formação de estruturas relaxadas ou lineares. Essas formas apresentam menor mobilidade e, portanto, migram mais lentamente no gel. Assim, mudanças no padrão de migração eletroforética indicam uma possível interação entre o composto e o DNA^{95,96}.

Conforme ilustrado na Figura 35B, três formas principais de DNA plasmidial podem ser observadas nesse tipo de análise:

Forma superenovelada (S): estrutura compacta e altamente enrolada, migra mais rapidamente no gel;

Forma circular ou aberta (C ou OC): uma fita do DNA é quebrada, reduzindo a compactação e tornando a migração mais lenta;

Forma linear (L): ambas as fitas são quebradas, resultando em uma estrutura que migra com mobilidade intermediária.

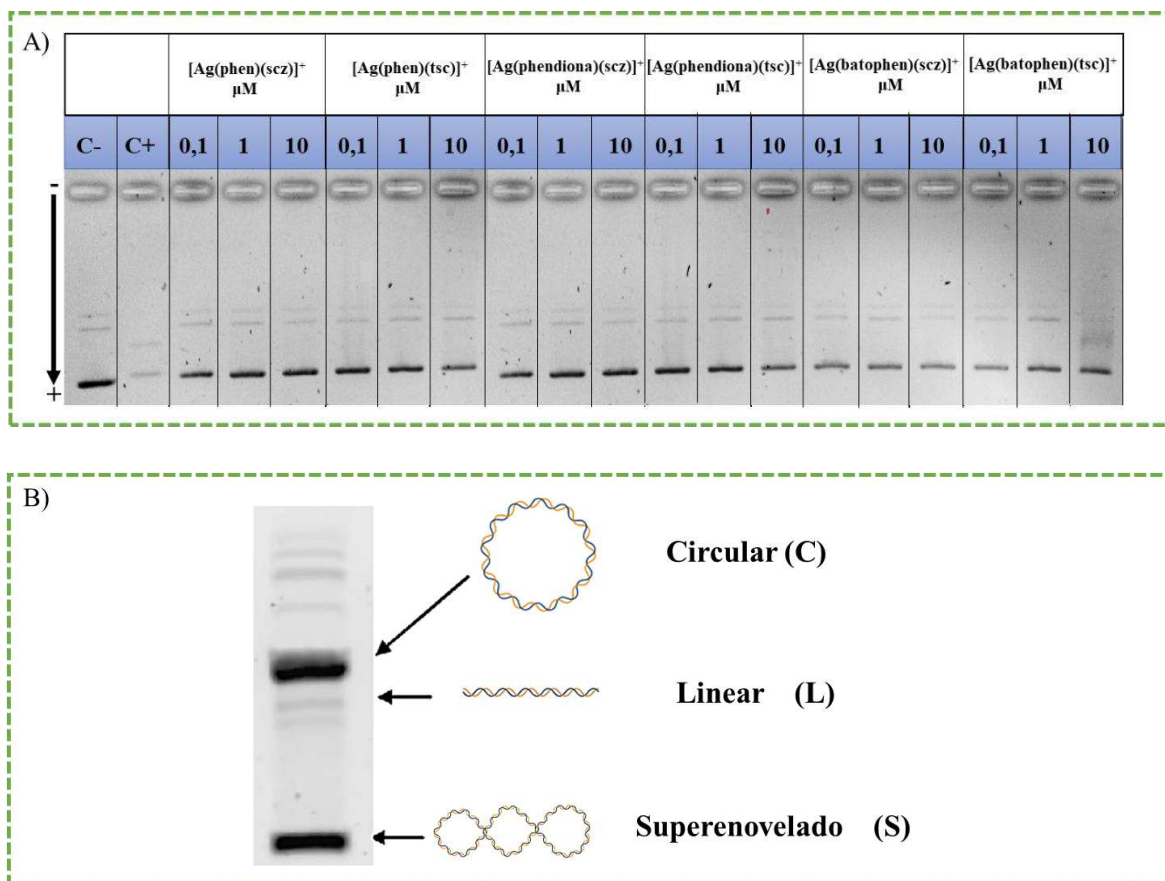


FIGURA 35: A) Gel de eletroforese onde no controle negativo: plasmídeo pUC19 + DMSO + TBE 1x (MIX). Controle positivo: cisplatina $[5,0 \times 10^{-6}\text{M}]^+$ (MIX) e nos outros poços variações das concentrações dos complexos + MIX. B) Conformações que o DNA pode assumir dependendo das interações.

Na FIGURA 35A, observa-se o perfil eletroforético obtido após incubação do DNA plasmidial com diferentes complexos metálicos. O controle negativo, contendo apenas o DNA plasmidial, apresenta uma única banda bem definida correspondente à forma superenovelada. O controle positivo, contendo cisplatina, um fármaco conhecido por se ligar covalentemente ao DNA,

apresenta padrão distinto, com redução da intensidade da banda superenovelada e aparecimento de bandas mais lentas, indicando modificação conformacional do DNA.

Por outro lado, nos poços contendo os complexos de prata, não foram observadas alterações no padrão de migração do DNA em comparação ao controle negativo. A presença de uma única banda com mobilidade idêntica à do DNA não tratado sugere que nenhum dos complexos testados interagiu de forma significativa com o plasmídeo superenovelado, ao menos nas condições experimentais empregadas (tempo de incubação, temperatura, concentração, etc).

Esse resultado indica que, sob as condições experimentais utilizadas, os complexos não interagem de forma detectável com o DNA plasmidial. A ausência de bandas características das formas relaxada ou linear sugere que não há intercalação significativa, ligação aos sulcos, nem clivagem do DNA. Assim, a atividade biológica previamente observada para esses complexos, como a ação citotóxica, provavelmente não está relacionada a mecanismos diretos de interação com o DNA, mas sim a outros alvos celulares, como proteínas, membranas ou enzimas.

4.13 Ensaio de inibição da enzima Topoisomerase II α e II β via eletroforese

A enzima topoisomerase II é uma enzima essencial envolvida na manutenção da topologia do DNA durante processos celulares fundamentais como replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica. Ela atua promovendo quebras transitórias em ambas as fitas do DNA, permitindo o desenovelamento e o alívio da supertorção, especialmente em regiões

compactadas de DNA superenovelado. Existem duas isoformas humanas desta enzima: Topoisomerase II α , geralmente expressa em células proliferativas e altamente associada à replicação celular, e Topoisomerase II β , mais relacionada a processos de transcrição e diferenciação celular⁹⁷⁻⁹⁹.

O ensaio de inibição de topoisomerasas por eletroforese é uma técnica bioquímica amplamente utilizada para avaliar se um composto interfere na atividade dessas enzimas. No experimento, um DNA plasmidial superenovelado (forma covalentemente fechada circular) é incubado com a enzima recombinante e com o composto de interesse. Em condições normais, a topoisomerase relaxa o DNA, convertendo a forma superenovelada em formas relaxadas, que apresentam menor mobilidade eletroforética em gel de agarose. A preservação da forma superenovelada no gel, mesmo após incubação com a enzima, indica que o composto inibiu sua atividade catalítica⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Esse ensaio é especialmente relevante para compostos com potencial citotóxico ou antitumoral, já que a inibição da topoisomerase II pode levar ao acúmulo de quebras duplas de DNA e, conseqüentemente, à morte celular. Muitos fármacos antitumorais, como etoposídeo e doxorrubicina, atuam justamente como inibidores da topoisomerase II, seja por estabilização do complexo clivado ou por impedimento da atividade catalítica da enzima.⁹⁸⁻¹⁰¹

Assim, a aplicação deste ensaio aos complexos de prata(I) sintetizados neste trabalho visa avaliar sua capacidade de interferir com a atividade da topoisomerase II α e II β , contribuindo para a elucidação de seus possíveis mecanismos de ação antitumoral.

A atividade inibitória dos complexos de prata(I) frente à enzima topoisomerase II foi avaliada por meio de ensaio de relaxamento de DNA

plasmidial superenovelado, visualizado por eletroforese em gel de agarose (FIGURA 36). No controle negativo (C–), onde o DNA foi incubado na ausência da enzima, observou-se predominantemente a forma superenovelada, que migra rapidamente no gel devido à sua estrutura compacta. Já no controle positivo (C+), contendo o DNA incubado com a enzima ativa, houve conversão majoritária para a forma relaxada, evidenciando a atuação da topoisomerase.

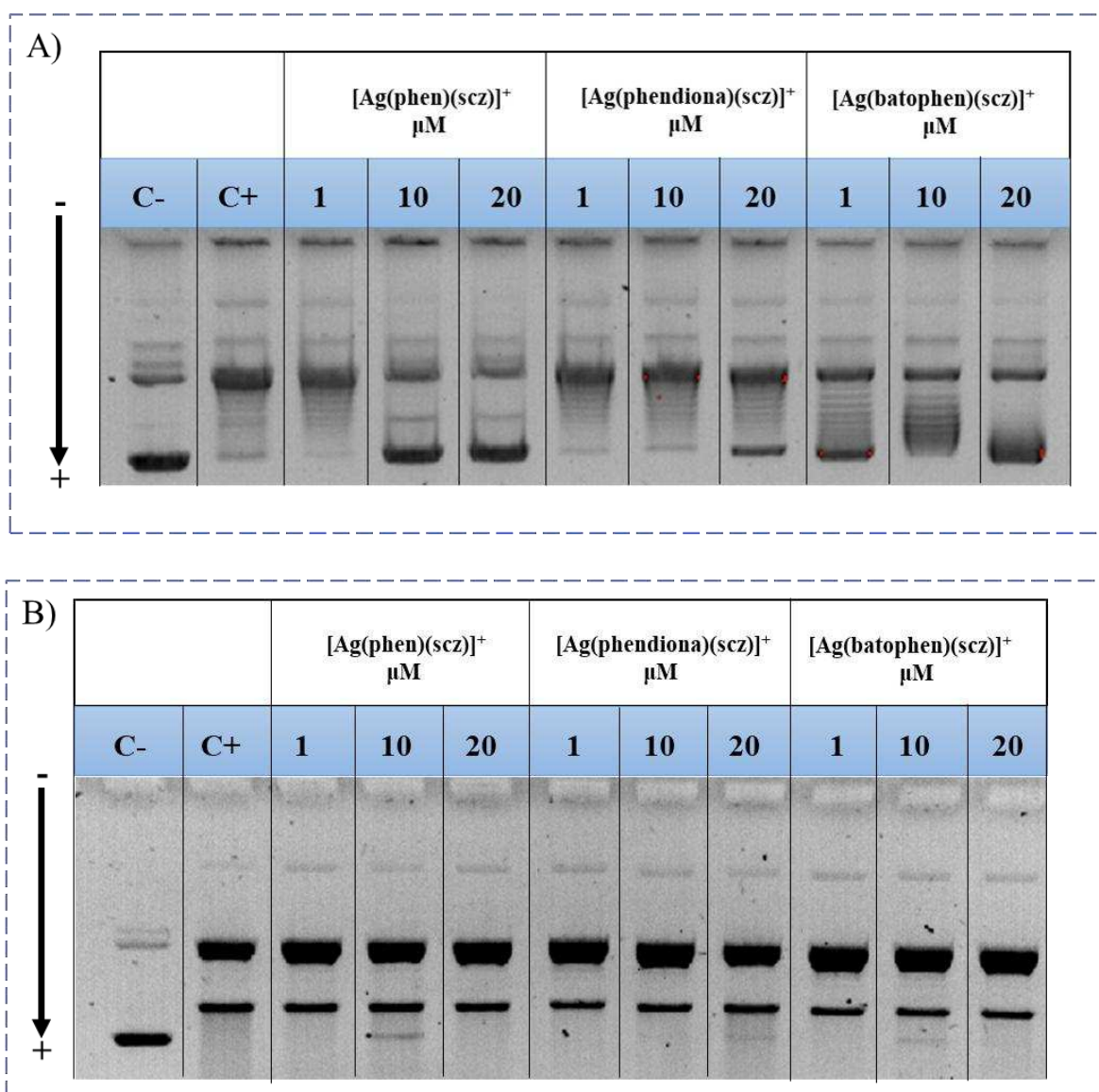


FIGURA 36: Gel de eletroforese para as diferentes isoformas das enzimas topoisomerasas na presença decrescente das concentrações dos complexos

respectivamente. a) TOPOII α ; C $^-$ = DNA; C $^+$ = DNA+ TOPOII α + ATP. b) C $^-$ = DNA; C $^+$ = DNA+ TOPOII β +ATP.

Os complexos foram testados em três concentrações (1, 10 e 20 μ M). O complexo [Ag(phen)(scz)] $^+$ demonstrou efeito inibitório moderado e dependente da concentração: em 1 μ M, o perfil de migração foi semelhante ao controle positivo, indicando baixa ou nenhuma inibição da enzima; entretanto, nas concentrações de 10 e 20 μ M, houve preservação da forma superenovelada, o que indica inibição progressiva da atividade catalítica da topoisomerase II α .

O complexo [Ag(phendiona)(scz)] $^+$ apresentou o maior potencial inibitório entre os três avaliados. Já em 1 μ M foi observada a presença da forma superenovelada, e em 10 e 20 μ M a inibição foi praticamente completa, com o DNA mantendo-se na conformação compacta. Este comportamento pode ser atribuído à maior planaridade e caráter eletrônico do ligante phendiona, favorecendo a interação com a enzima ou com o DNA.

Por sua vez, o complexo [Ag(batophen)(scz)] $^+$ apresentou efeito inibitório mais discreto, sendo necessário atingir 20 μ M para que a forma superenovelada predominasse. Em 1 μ M, o perfil eletroforético se assemelhou ao do controle positivo, e em 10 μ M observou-se um padrão intermediário, sugerindo atividade inibitória mais fraca. A estrutura volumosa e mais hidrofóbica do ligante batophen pode dificultar o acesso ao sítio ativo da enzima ou à interação eficiente com o DNA plasmidial.

De forma geral, os resultados demonstram que os complexos de prata(I) contendo semicarbazonas são capazes de inibir a topoisomerase II α de maneira concentração-dependente, sendo a natureza do ligante fenantrolínico um fator determinante na potência inibitória. A atuação sobre essa enzima, que

está diretamente envolvida na manutenção da topologia do DNA durante a replicação e transcrição, reforça o potencial dos complexos como agentes antitumorais, uma vez que a topoisomerase II α é um dos principais alvos moleculares de diversas drogas utilizadas na quimioterapia.

Por outro lado, os ensaios realizados com a topoisomerase II β sob as mesmas condições experimentais e concentrações revelaram um comportamento significativamente distinto (FIGURA 36B). Nenhum dos complexos avaliados foi capaz de impedir de maneira clara a ação da enzima, mesmo em 20 μ M. Todos os poços tratados com os complexos apresentaram perfis eletroforéticos similares ao controle positivo (C+), com predominância das formas relaxadas de DNA.

Esses resultados apontam para uma seletividade dos complexos pela isoforma II α da topoisomerase, o que é de grande relevância no contexto antitumoral. Essa seletividade pode decorrer de fatores como diferenças na conformação tridimensional do sítio de ligação das isoformas, grau de exposição de resíduos-chave à interação com o composto, ou mesmo da acessibilidade ao DNA durante o ciclo catalítico. Trabalhos anteriores também sugerem que a isoforma II α tende a ser mais suscetível a inibidores metálicos por seu papel mais direto na replicação de DNA, sendo superexpressa em diversos tipos de câncer, enquanto a isoforma II β está mais associada a funções celulares basais.

Portanto, a inibição seletiva da topoisomerase II α observada neste trabalho reforça o potencial terapêutico dos complexos sintetizados, especialmente em aplicações oncológicas. A menor afinidade ou ausência de inibição da topoisomerase II β pode ser interpretada como um aspecto positivo,

uma vez que essa isoforma está presente em tecidos normais e sua inibição está associada a efeitos colaterais adversos, como cardiotoxicidade observada com fármacos como a doxorrubicina. Assim, a seletividade dos complexos pode contribuir para um perfil de ação mais direcionado e seguro, o que é desejável no desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

5. CONCLUSÃO

Nesta tese foram sintetizados e caracterizados complexos inéditos de prata(I) com ligantes fenantrolínicos (phen, phendiona e batophen) e (tio)semicarbazonas (scz e tsc), obtidos em boas condições sintéticas e com rendimentos satisfatórios. A caracterização espectroscópica e analítica confirmou a formação de espécies mononucleares estáveis, revelando alterações típicas da coordenação metálica, compatíveis com as expectativas estruturais para esse sistema.

Do ponto de vista biológico, os complexos mostraram-se significativamente mais ativos que os ligantes livres e o sal de prata, evidenciando que a coordenação a Ag(I) é determinante para conferir seletividade e potência. Em especial, $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ e $[Ag(batophen)(scz)]^+$ apresentaram atividade citotóxica submicromolar em células tumorais, aliada a índices de seletividade favoráveis frente a células não tumorais. Ensaio complementares confirmaram a capacidade desses compostos de inibir a topoisomerase II α , sem afetar a isoforma II β , e de reduzir a clonogenicidade e o crescimento em culturas 3D, reforçando sua relevância como candidatos antitumorais.

No campo antimicrobiano, os complexos exibiram atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com destaque para $[Ag(phendiona)(scz)]^+$, ativo em baixas concentrações contra *S. aureus*. Esse resultado amplia o espectro farmacológico da série e reforça seu potencial em um cenário de resistência microbiana crescente.

No campo anti-*Leishmania* (triagem exploratória em promastigotas), os complexos com phendiona/batophen exibiram EC₅₀

submicromolares contra *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, com índices de seletividade de até 12,7 frente a RAW 264.7, sustentando a priorização desses protótipos para etapas futuras em amastigotas intracelulares e, quando aplicável, modelos *in vivo*.

De forma reflexiva, os achados mostram que ligantes biologicamente inertes, como scz e tsc, adquirem nova funcionalidade ao se coordenarem a prata(I), enquanto ligantes aromáticos ativos têm sua potência modulada ou ampliada pelo metal. Essa sinergia entre centro metálico e ligantes não apenas atende ao objetivo de gerar novas entidades químicas, mas também fornece insights para o desenho racional de fármacos baseados em coordenação.

Assim, esta tese alcança seu propósito central: integrar síntese inorgânica e avaliação biológica para identificar estruturas com real potencial terapêutico. Os resultados obtidos consolidam os complexos de prata(I) descritos como plataformas promissoras para aplicações antitumorais, antimicrobianas e anti-leishmaniose, além de abrirem caminhos para estudos mecanísticos avançados e futuros ensaios *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TEIXEIRA, Lúcia Martins et al. *Staphylococcus aureus*. Microbiologia. Atheneu, São Paulo, p. 175-182, 2008.
2. MARTINEZ, Jose L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 11, p. 33-39, 2014.
3. PIDDOCK, Laura JV. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward?. *The Lancet infectious diseases*, v. 12, n. 3, p. 249-253, 2012.
4. EGAN, Alexander Jf. Bacterial outer membrane constriction. *Molecular microbiology*, v. 107, n. 6, p. 676-687, 2018.
5. ROHDE, Manfred. The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology spectrum*, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. gpp3-0044-2018, 2019.
6. SILHAVY, Thomas J. Classic spotlight: Gram-negative bacteria have two membranes. *Journal of bacteriology*, v. 198, n. 2, p. 201-201, 2016.
7. RAJAGOPAL, Mithila; Walker, Suzanne. Envelope structures of Gram-positive bacteria. *Protein and sugar export and assembly in Gram-positive bacteria*, p. 1-44, 2016.
8. TORTORA, G. J.; Funke, B. R.; Case, Christine L. *Microbiologia*. 10ªed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
9. PANCU, Daniel Florin et al. Antibiotics: conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity—a pharmaco-toxicological screening. *Antibiotics*, v. 10, n. 4, p. 401, 2021.
10. KAPOOR, Garima; Saigal, Saurabh; Elongavan, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017.
11. Lumen Learning. *Mechanisms of Antibacterial Drugs*. Disponível em: <https://courses.lumenlearning.com/suny-mcc-microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>. Acesso em: 15 jun. 2025.
12. DE JESUS NASCIMENTO FERREIRA, Tatiana et al. Community use of systemic antibiotics among individuals aged 15 and over in Brazil: A seven-year population-based cross-sectional study. *PLoS One*, v. 20, n. 6, p. e0325231, 2025.
13. VISWANATHAN, V. K. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut microbes*, v. 5, n. 1, p. 3-4, 2014.
14. LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de saúde pública*, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

15. REIS, Jéssika Vieira dos et al. Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de uma hidrazona e seus complexos metálicos. 2018.
16. MADIGAN, Michael T. et al. Microbiologia de Brock-14ª Edição. Artmed Editora, 2016.
17. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS*. 05 nov. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>. Acesso em: 15 jun. 2025.
18. VENTOLA, C. Lee. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.
19. SENGUPTA, Saswati; CHATTOPADHYAY, Madhab K.; GROSSART, Hans-Peter. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, v. 4, p. 47, 2013.
20. GORLE, Anil K. et al. Mononuclear Polypyridylruthenium (II) Complexes with High Membrane Permeability in Gram-Negative Bacteria—in particular *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry—A European Journal*, v. 21, n. 29, p. 10472-10481, 2015.
21. KHALAJI, Aliakbar Dehno et al. Silver (I) thiosemicarbazone complex [Ag (catsc)(PPh 3) 2] NO 3: Synthesis, characterization, crystal structure, and antibacterial study. *Comptes Rendus. Chimie*, v. 20, n. 5, p. 534-539, 2017.
22. Instituto Nacional De Câncer (INCA). *O que é câncer*. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 15 jun. 2025.
23. Organização Pan-Americana Da Saúde (Opas). *Carga global de câncer aumenta em meio à crescente necessidade de serviços*. 1 fev. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2024-carga-global-cancer-aumenta-em-meio-crescente-necessidade-servicos>. Acesso em: 15 jun. 2025.
24. MANN, Sarah et al. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. *Current tropical medicine reports*, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.
25. WARE, JeanAnne M. et al. Efficacy and tolerability of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 73, n. 7, p. e2457-e2562, 2021.
26. MESQUITA, Marcelo Ribeiro et al. Association between the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* and tree families in a Brazilian tropical urban area. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, v. 85, n. 1, p. 38, 2024.
27. SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

28. DE MARTEL, Catherine et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet global health*, v. 8, n. 2, p. e180-e190, 2020.
29. MEDICI, Serenella et al. Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. *Journal of medicinal chemistry*, v. 62, n. 13, p. 5923-5943, 2019.
30. HEALY, M. L.; LIM, K. K. T.; TRAVERS, R. Jacques Forestier (1890–1978) and gold therapy. *International journal of Rheumatic diseases*, v. 12, n. 2, p. 145-148, 2009.
31. PELGRIFT, Robert Y.; FRIEDMAN, Adam J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 2013.
32. BARILLO, David J.; MARX, David E. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns*, v. 40, p. S3-S8, 2014.
33. MARX, David E.; BARILLO, David J. Silver in medicine: the basic science. *Burns*, v. 40, p. S9-S18, 2014..
34. MEDICI, Serenella et al. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 284, p. 329-350, 2015.
35. SILVER, Simon. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS microbiology reviews*, v. 27, n. 2-3, p. 341-353, 2003.
36. NOMIYA, K. et al. Synthesis and characterization of polymeric, anionic thiosalicylato-Ag (I) complexes with antimicrobial activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 58, n. 4, p. 255-267, 1995.
37. KLASSEN, H. J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, v. 26, n. 2, p. 117-130, 2000.
38. DRAKE, Pamela L.; HAZELWOOD, Kyle J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Annals of Occupational Hygiene*, v. 49, n. 7, p. 575-585, 2005.
39. HARTINGER, Christian G.; DYSON, Paul J. Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 2, p. 391-401, 2009.
40. MEDICI, Serenella et al. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 327, p. 349-359, 2016.
41. EBRAHIMINEZHAD, Alireza et al. Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies*, v. 2, n. 1, p. 122-128, 2016.

42. MIJNENDONCKX, Kristel et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, v. 26, n. 4, p. 609-621, 2013.
43. BANTI, C. N. et al. Mixed ligand–silver (I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis. *Metallomics*, v. 4, n. 6, p. 545-560, 2012.
44. XU, Fang Fang; IMLAY, James A. Silver (I), mercury (II), cadmium (II), and zinc (II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 10, p. 3614-3621, 2012.
45. SATURNINO, Carmela et al. N-heterocyclic carbene complexes of silver and gold as novel tools against breast cancer progression. *Future Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 18, p. 2213-2229, 2016.
46. KÖNIGS, Alexa M.; FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. Nanosilver induces a non-culturable but metabolically active state in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 395, 2015.
47. WAKSHLAK, Racheli Ben-Knaz; PEDAHZUR, Rami; AVNIR, David. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the " zombies " effect. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 9555, 2015.
48. BEN-KNAZ WAKSHLAK, Racheli; PEDAHZUR, Rami; AVNIR, David. Antibacterial activity of chlorhexidine-killed bacteria: The zombie cell effect. *ACS omega*, v. 4, n. 25, p. 20868-20872, 2019.
49. BANTI, Christina N. et al. Nimesulide silver metallodrugs, containing the mitochondriotropic, triaryl derivatives of pnictogen; Anticancer activity against human breast cancer cells. *Inorganic chemistry*, v. 55, n. 17, p. 8681-8696, 2016.
50. ENGELBRECHT, Zelinda; MEIJBOOM, Reinout; CRONJÉ, Marianne J. The ability of silver (I) thiocyanate 4-methoxyphenyl phosphine to induce apoptotic cell death in esophageal cancer cells is correlated to mitochondrial perturbations. *BioMetals*, v. 31, n. 2, p. 189-202, 2018..
51. SILVA, Débora ES et al. Cytotoxic and apoptotic effects of ternary silver (i) complexes bearing 2-formylpyridine thiosemicarbazones and 1, 10-phenanthroline. *Dalton Transactions*, v. 49, n. 16, p. 5264-5275, 2020.
52. BISWAS, Chinmoy et al. Synthesis, structural characterization and selective anticancer activity of $[AgI(L)(PPh_3)]_2(NO_3)_2$ [$L = N(4)$ -substituted 2-acetylpyridine- $N(4)$ -methyl-3-thiosemicarbazone]. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 136, p. 109178, 2022.
53. ALMEIDA, Vitor YG et al. Cytotoxicity and antibacterial activity of silver complexes bearing semicarbazones and triphenylphosphine. *ChemistrySelect*, v. 5, n. 46, p. 14559-14563, 2020.

54. RAJU, Senthil Kumar et al. Silver complexes as anticancer agents: A perspective review. *German Journal of Pharmaceuticals and Biomaterials*, v. 1, n. 1, p. 6-28, 2022.
55. MEDICI, Serenella et al. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 327, p. 349-359, 2016.
56. PEARSON, Ralph G. Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical society*, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.
57. HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A. G. *Inorganic chemistry* 4th Edition. 2012.
58. JOHNSON, Nicholas A.; SOUTHERLAND, Marie R.; YOUNGS, Wiley J. Recent developments in the medicinal applications of silver-NHC complexes and imidazolium salts. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. 1263, 2017.
59. ARANCIBIA, Rodrigo et al. Palladium (II) and platinum (II) complexes containing organometallic thiosemicarbazone ligands: Synthesis, characterization, X-ray structures and antitubercular evaluation. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 55, p. 139-142, 2015.
60. METWALLY, Mohamed A. et al. Thiosemicarbazides: synthesis and reactions. *Journal of Sulfur Chemistry*, v. 32, n. 5, p. 489-519, 2011.
61. YOUSEF, Tarek A. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of some synthesized 4-(2-pyridyl)-3-Thiosemicarbazides derivatives. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 3, n. 2, p. 37-46, 2011.
62. MULETA, Fekadu; ALANSI, T.; ESWARAMOORTHY, RJJNSR. A review on synthesis characterization methods and biological activities of semicarbazone thiosemi-carbazone and their transition metal complexes. *J. Nat. Sci. Res*, v. 9, n. 17, p. 33-46, 2019.
63. MIR, Irtiqa Ashraf et al. A review of semicarbazone-derived metal complexes for application in biomedicine and related fields. *Journal of Molecular Structure*, v. 1295, p. 136216, 2024.
64. ASIF, Mohammad; ALGHAMDI, Saad. Chemical and Biological potentials of semicarbazide and thiosemicarbazide derivatives and their metals complexes. *Advanced Journal of Chemistry, Section B*, v. 3, n. 3, p. 243-270, 2021.
65. ZHENG, Yunyun et al. Recent progress in thiocarbazon metal complexes for cancer therapy via mitochondrial signalling pathway. *Frontiers in Chemistry*, v. 12, p. 1424022, 2024.
66. MALARZ, Katarzyna et al. The role of oxidative stress in activity of anticancer thiosemicarbazones. *Oncotarget*, v. 9, n. 25, p. 17689, 2018.

67. DA SILVA MIRANDA, Fabio et al. Synthesis of substituted dipyrdo [3, 2-a: 2', 3'-c] phenazines and a new heterocyclic dipyrdo [3, 2-f: 2', 3'-h] quinoxalino [2, 3-b] quinoxaline. *Tetrahedron*, v. 64, n. 22, p. 5410-5415, 2008.
68. EBRAHIMI, Hossein Pasha et al. A novel series of thiosemicarbazone drugs: from synthesis to structure. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 137, p. 1067-1077, 2015.
69. DE OLIVEIRA, Renata B. et al. Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, v. 43, n. 9, p. 1983-1988, 2008.
70. JAMAL, Siddiqui Eram et al. Thiosemicarbazone Complexes as Versatile Medicinal Chemistry Agents: A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, v. 9, n. 3, 2019.
71. OLIVEIRA, Vanessa da Silva et al. SEMICARBAZONES: INTERDISCIPLINARY APPROACH IN EXPERIMENTAL CLASSES OF ORGANIC CHEMISTRY AND MEDICINAL CHEMISTRY. *QUIMICA NOVA*, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2023.
72. BISCEGLIE, Franco et al. Cinnamaldehyde and cuminaldehyde thiosemicarbazones and their copper (II) and nickel (II) complexes: A study to understand their biological activity. *Journal of inorganic biochemistry*, v. 140, p. 111-125, 2014.
73. LOBANA, Tarlok S. et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—an overview. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, n. 7-8, p. 977-1055, 2009.
74. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Chapter 3, Proton NMR spectrometry. *Spectrometric identification of organic compounds (7th ed.)*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, p. 127-203, 2005.
75. PAVIA, D. et al. *Introdução à espectroscopia*. Cengage Learning, 2012.
76. NOVOTNY, Jan; KOMOROVSKY, Stanislav; MAREK, Radek. Paramagnetic Effects in NMR Spectroscopy of Transition-Metal Complexes: Principles and Chemical Concepts. *Accounts of Chemical Research*, v. 57, n. 10, p. 1467-1477, 2024.
77. ROCHA, Josias S. et al. Synthesis and characterization of silver (I) complexes bearing phenanthroline derivatives as ligands: Cytotoxicity and DNA interaction evaluation. *Inorganic chemistry communications*, v. 131, p. 108757, 2021.
78. GEARY, William J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 7, n. 1, p. 81-122, 1971.

79. MCINDOE, J. Scott; VIKSE, Krista L. Assigning the ESI mass spectra of organometallic and coordination compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 54, n. 5, p. 466-479, 2019.
80. DI MARCO, Valerio B.; BOMBI, G. Giorgio. Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 25, n. 3, p. 347-379, 2006.
81. MCCANN, Malachy et al. In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1, 10-phenanthroline, 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione and its copper (II) and silver (I) complexes. *Toxicology Research*, v. 1, n. 1, p. 47-54, 2012.
82. MURPHY, Damien M. et al. Electrochemical and spectroelectrochemical studies of complexes of 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione. *Inorganica Chimica Acta*, v. 374, n. 1, p. 435-441, 2011.
83. NA, FRANKEN. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, v. 1, p. 2315-2319, 2006.
84. MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
85. MIRZAYANS, Razmik et al. A sensitive assay for the evaluation of cytotoxicity and its pharmacologic modulation in human solid tumor-derived cell lines exposed to cancer-therapeutic agents. *J Pharm Pharm Sci*, v. 10, n. 2, p. 298s-311s, 2007.
86. KROEMER, Guido et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.
87. ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
88. PARK, Wonyoung et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental & molecular medicine*, v. 55, n. 8, p. 1573-1594, 2023.
89. FRIEDRICH, Juergen et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature protocols*, v. 4, n. 3, p. 309-324, 2009.
90. IMAMURA, Yoshinori et al. Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology reports*, v. 33, n. 4, p. 1837-1843, 2015.
91. EDMONDSON, Rasheena et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.
92. PAKRAVAN, Parvaneh; MASOUDIAN, Shahla. Study on the interaction between isatin- β -thiosemicarbazone and calf thymus DNA by spectroscopic

- techniques. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, v. 14, n. 1, p. 111, 2015.
93. DOMYATI, Doaa et al. Synthesis, crystal structural description, DNA binding, molecular docking, and anticancer evaluation of the novel platinum (IV) supramolecular complex. BMC chemistry, v. 19, n. 1, p. 102, 2025.
 94. BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Embrapa Trigo. Documentos Online, v. 6, 2001.
 95. ROCHA, Josias S. et al. Synthesis and characterization of silver (I) complexes bearing phenanthroline derivatives as ligands: Cytotoxicity and DNA interaction evaluation. Inorganic chemistry communications, v. 131, p. 108757, 2021.
 96. NITISS, John L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nature Reviews Cancer, v. 9, n. 5, p. 338-350, 2009.
 97. AUSTIN, Caroline A.; MARSH, Katherine L. Eukaryotic DNA topoisomerase II β . Bioessays, v. 20, n. 3, p. 215-226, 1998.
 98. BUZUN, Kamila et al. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 35, n. 1, p. 1781-1799, 2020.
 99. AKINYEMI, Amos Olalekan et al. Topoisomerase II Inhibition in Cancer: A Focus on Metal Complexes. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2025.
 100. SILVA, Ludimila Thayane Paes et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity study, interaction with DNA and topoisomerase II α of square-planar complexes with thiosemicarbazones. Polyhedron, v. 257, p. 117021, 2024.
 101. BJORNSTI, Mary-Ann; KAUFMANN, Scott H. Topoisomerases and cancer chemotherapy: Recent advances and unanswered questions. F1000Research, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-1704, 2019.

7. APÊNDICE

7.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

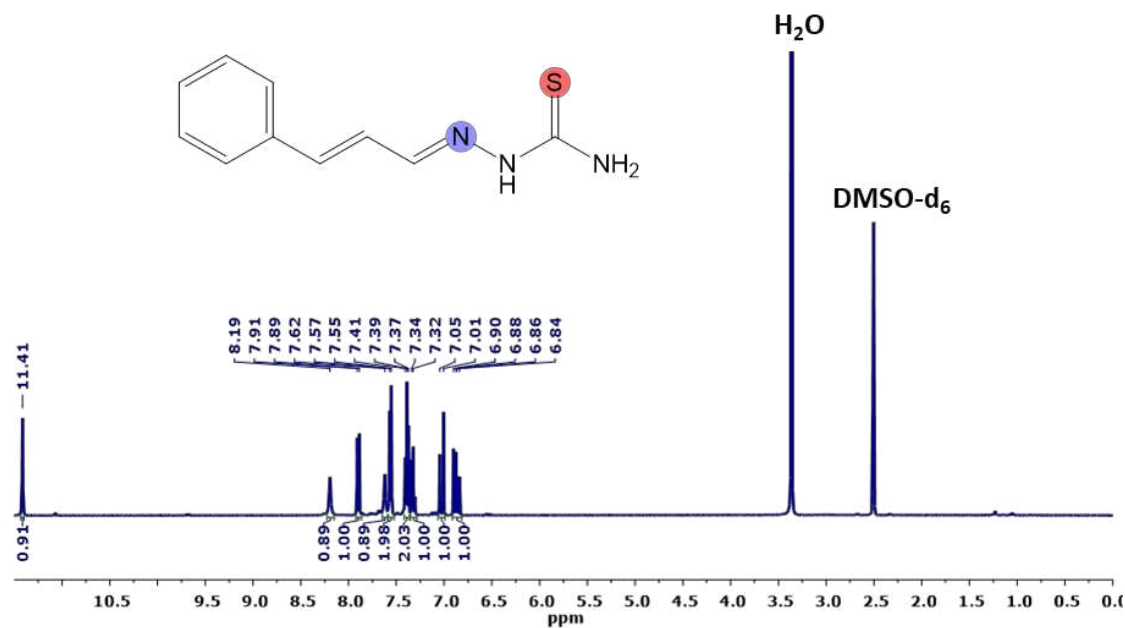


FIGURA A1. Espectro de RMN de ¹H para o ligante tiossemicarbazona em DMSO-d₆.

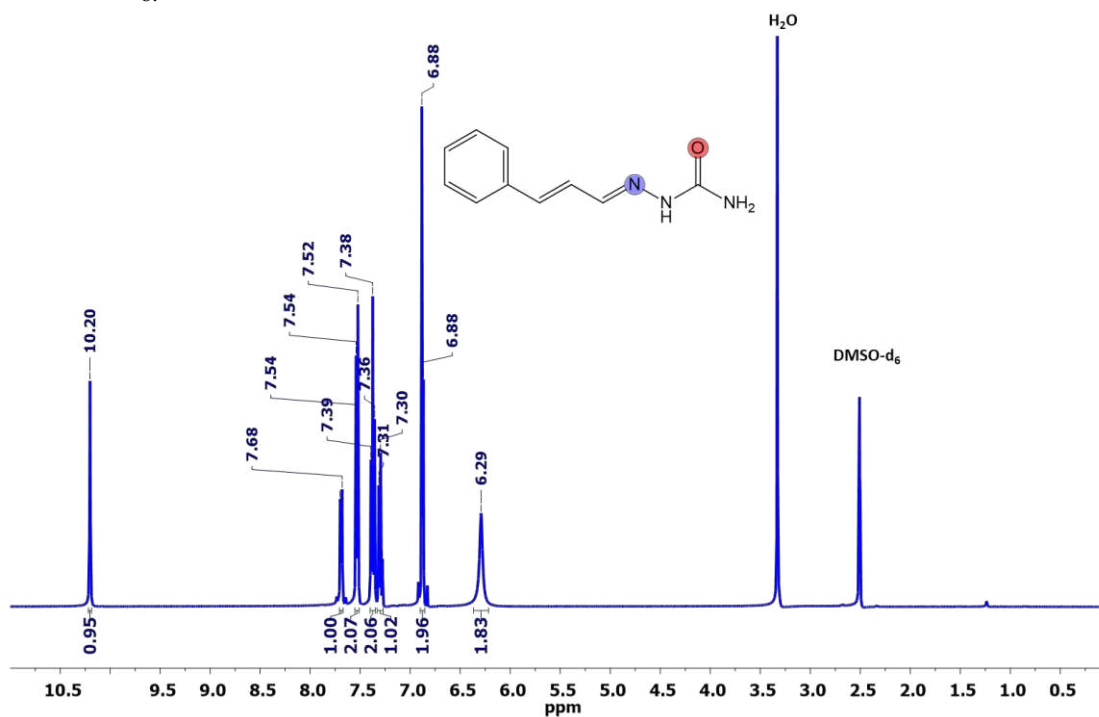


FIGURA A2. Espectro de RMN de ^1H para o ligante semicarbazona em DMSO-d_6 .

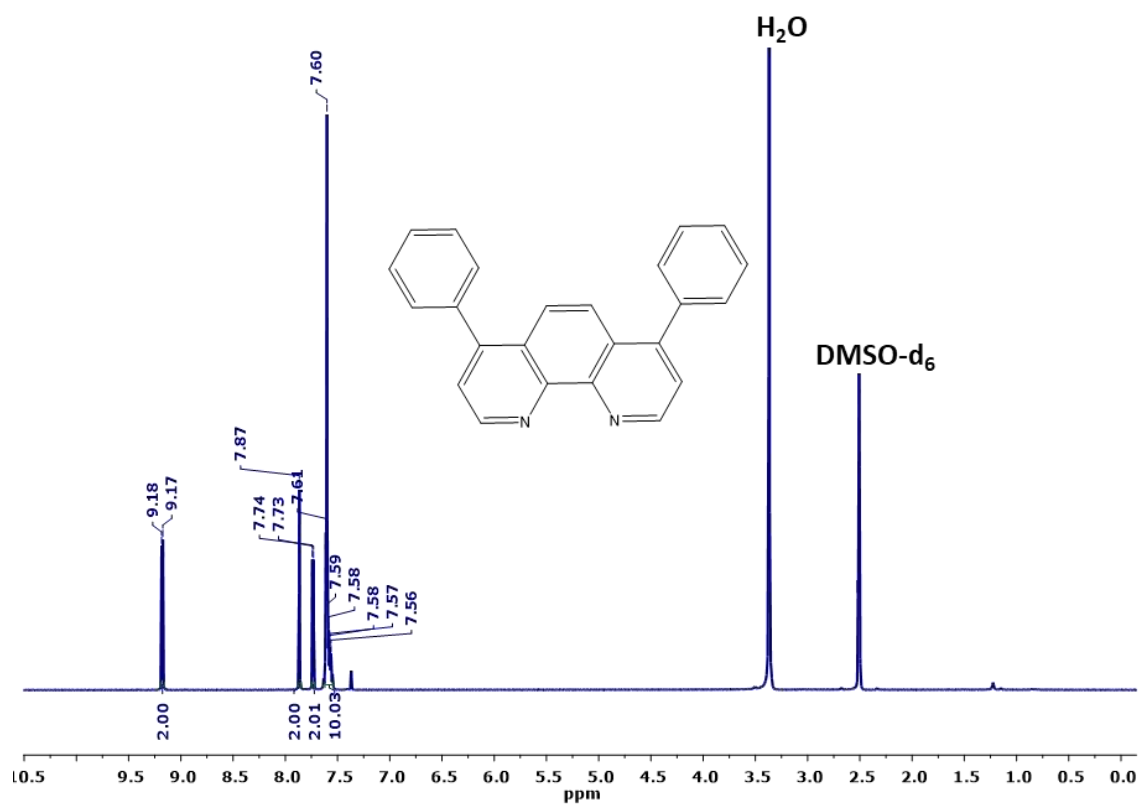


FIGURA A3. Espectro de RMN de ^1H para o ligante batophen em DMSO-d_6 .

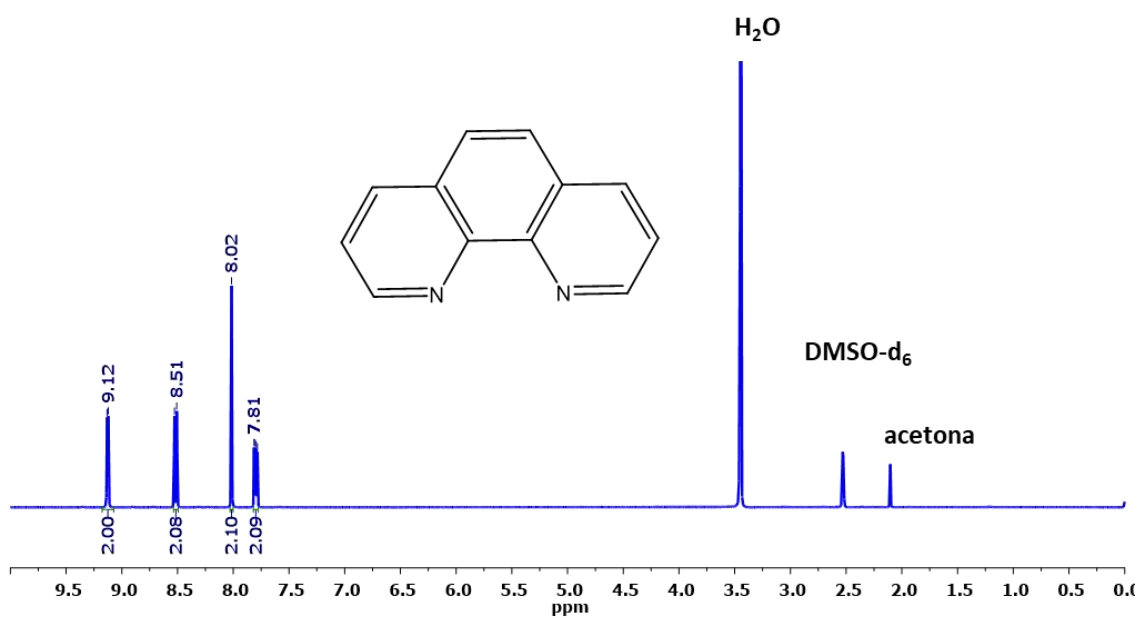


FIGURA A4. Espectro de RMN de ^1H para o ligante 1,10-fenantrolina em DMSO-d_6 .

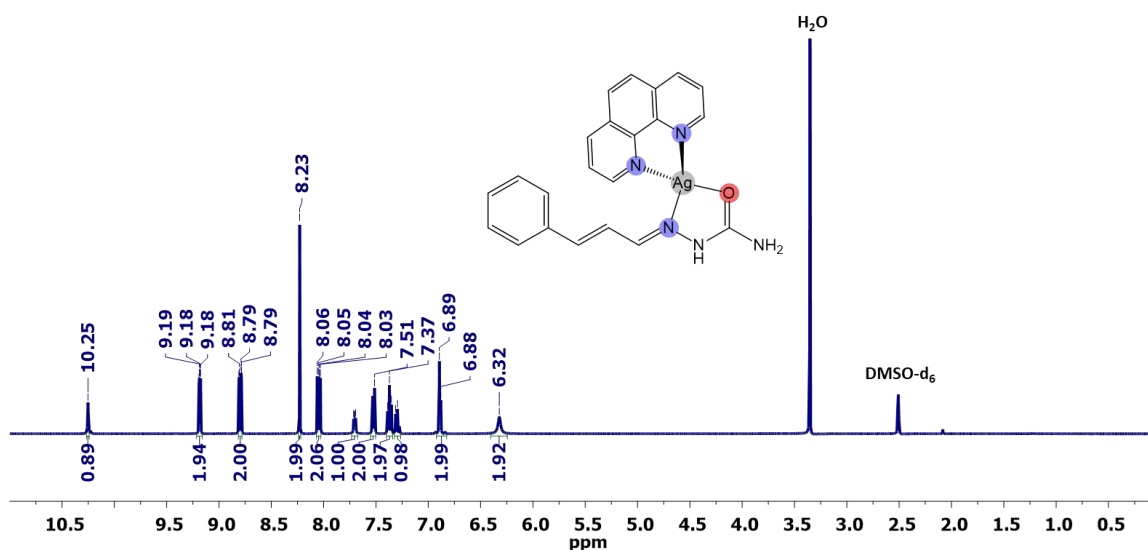


FIGURA A5. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{scz})]^+$ em DMSO-d_6 .

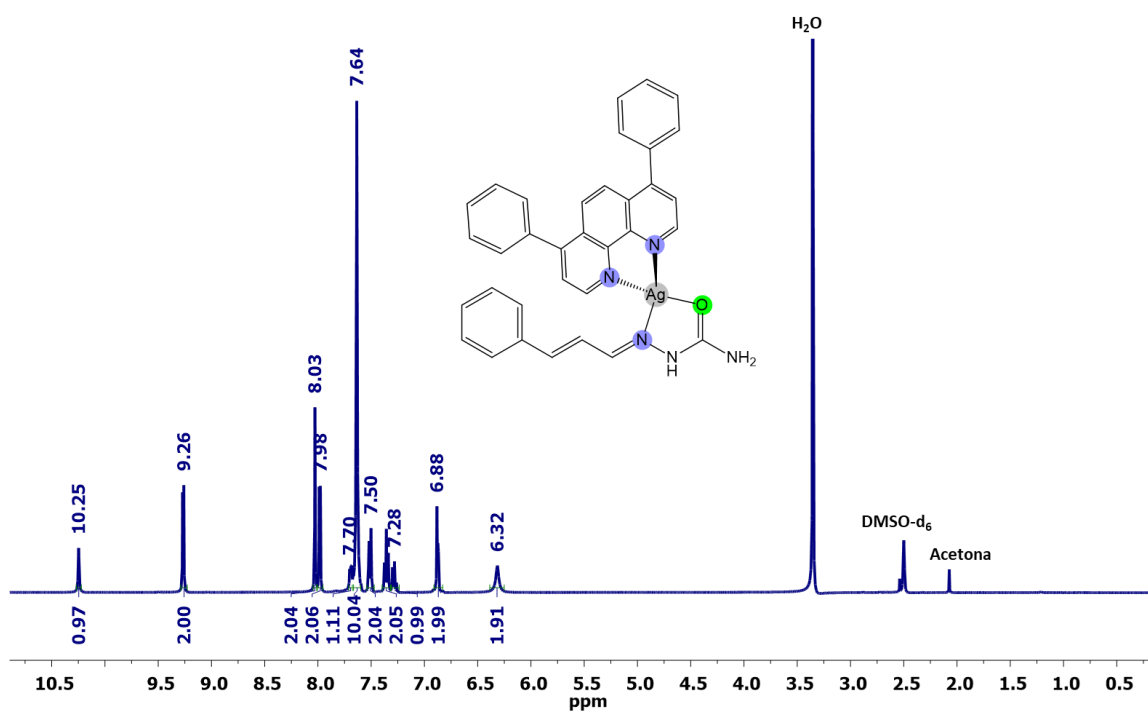


FIGURA A6. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $[\text{Ag}(\text{batophen})(\text{scz})]^+$ em DMSO-d_6 .

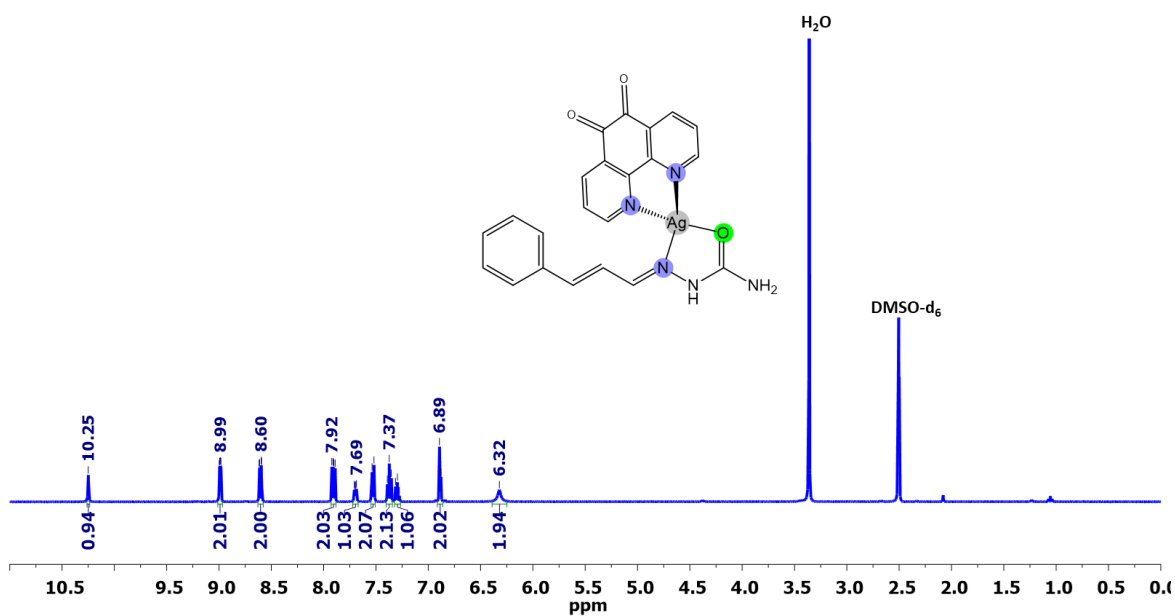


FIGURA A7. Espectro de RMN de 1H para o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ em DMSO-d₆.

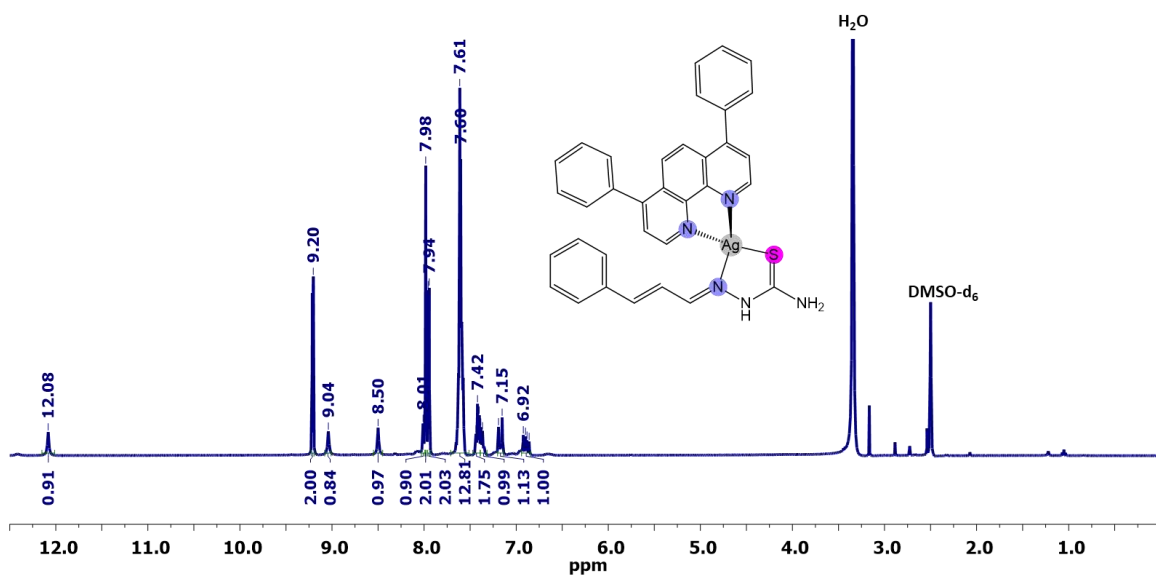


FIGURA A8. Espectro de RMN de 1H para o complexo $[Ag(batophen)(tsc)]^+$ em DMSO-d₆.

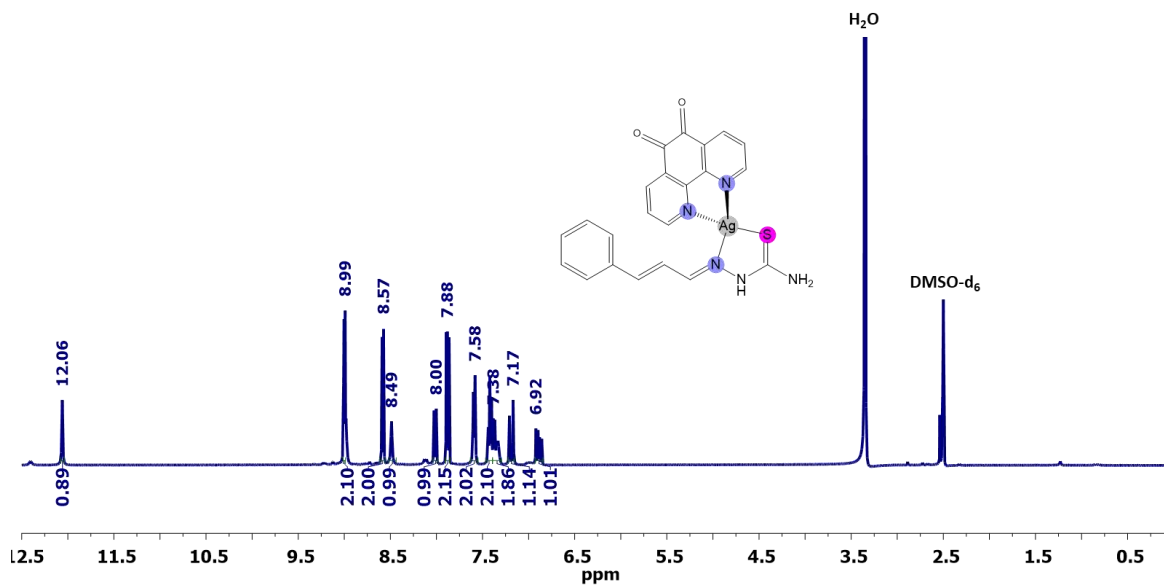


FIGURA A9. Espectro de RMN de 1H para o complexo $[Ag(phendiona)(tsc)]^+$ em $DMSO-d_6$.

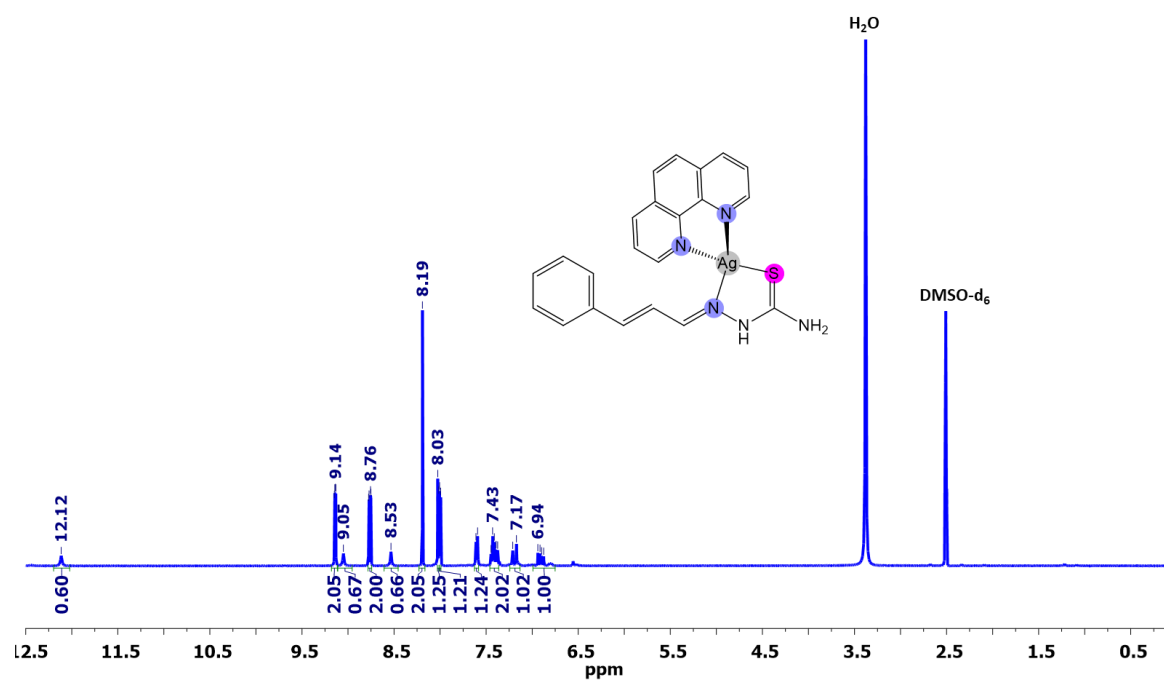


FIGURA A10. Espectro de RMN de 1H para o complexo $[Ag(phen)(tsc)]^+$ em $DMSO-d_6$.

7.2 Espectrometria de Massas

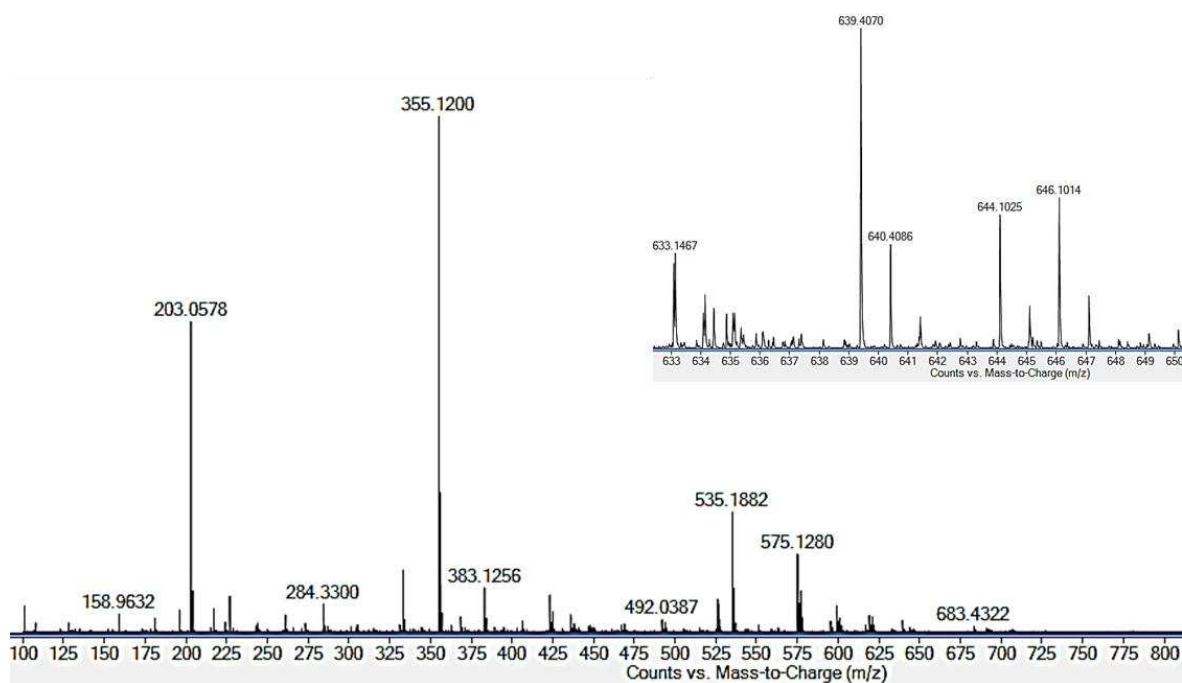


FIGURA A11. Espectro de massas full scan para o complexo $[Ag(batophen)(tsc)]^+$.

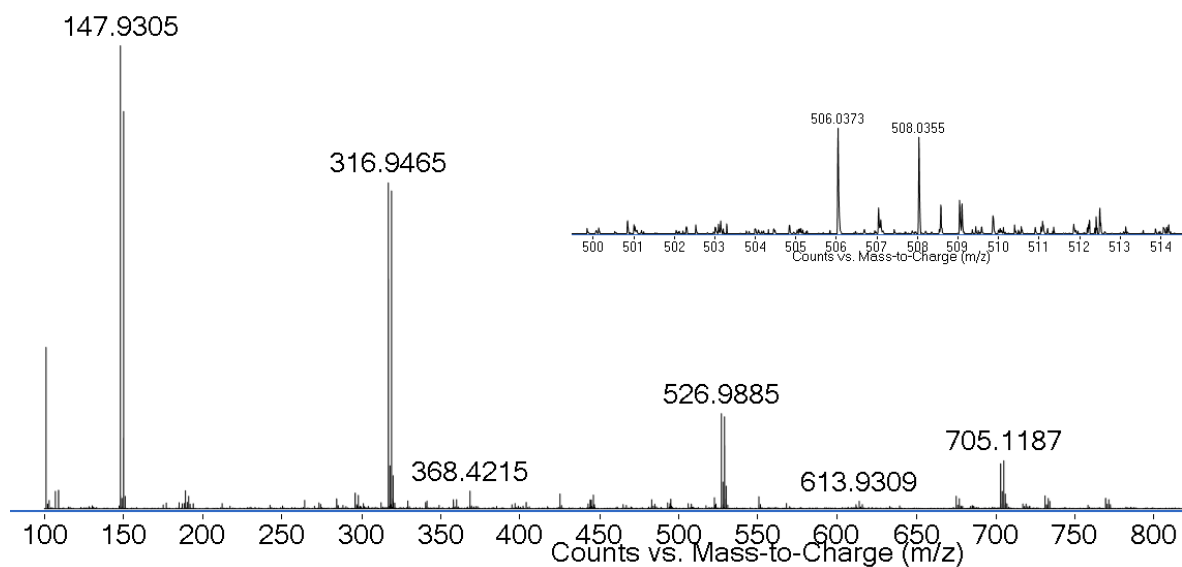


FIGURA A12. Espectro de massas para o complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$.

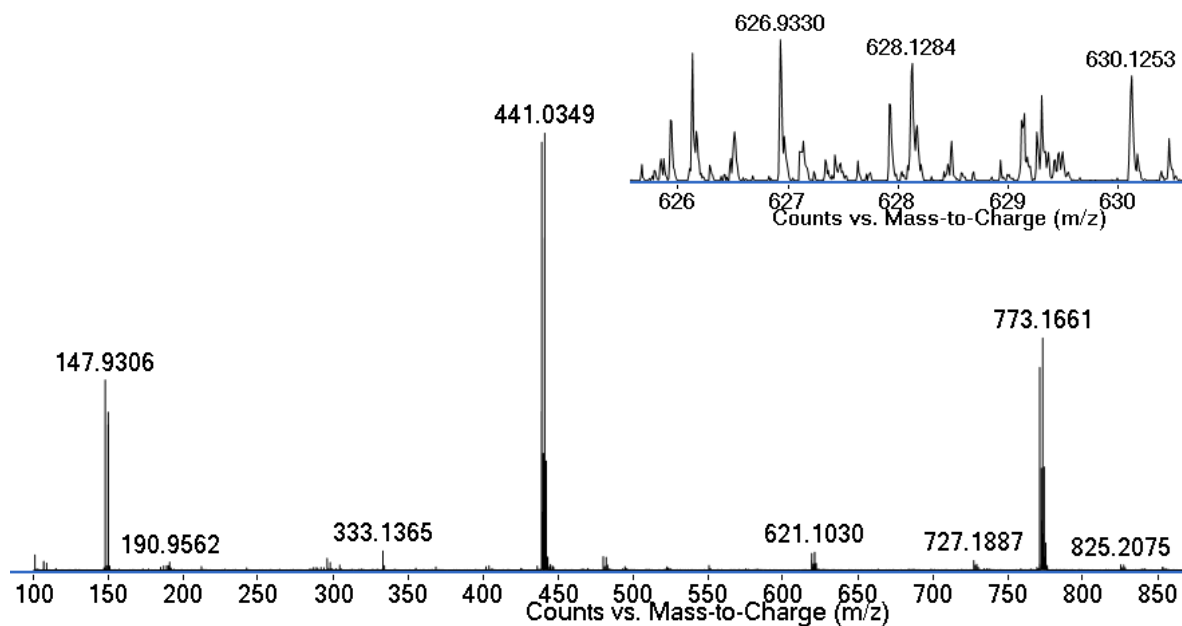


FIGURA A13. Espectro de massas para o complexo $[Ag(batophen)(scz)]^+$.

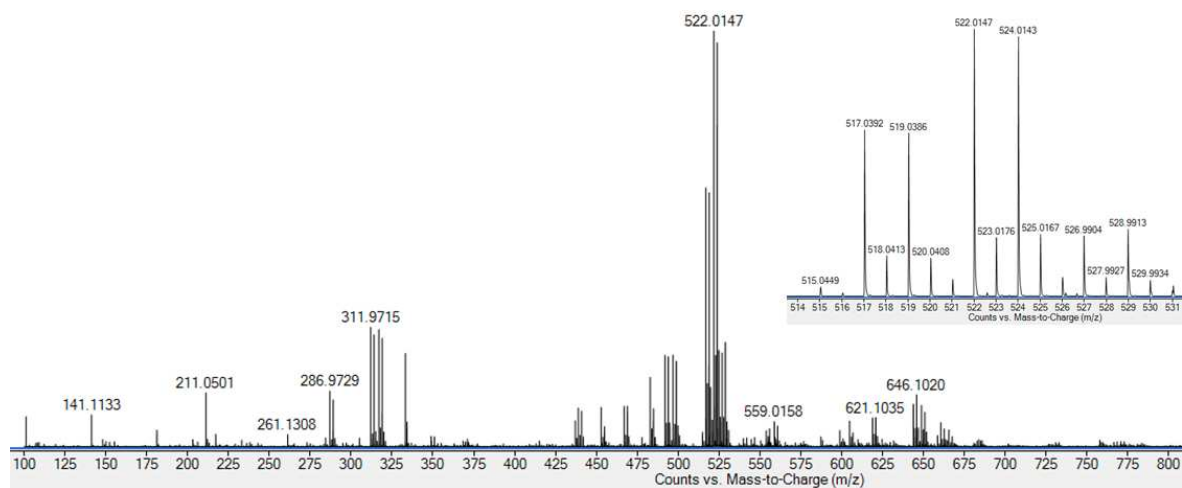


FIGURA A14. Espectro de massas para o complexo $[Ag(phendiona)(tsc)]^+$.

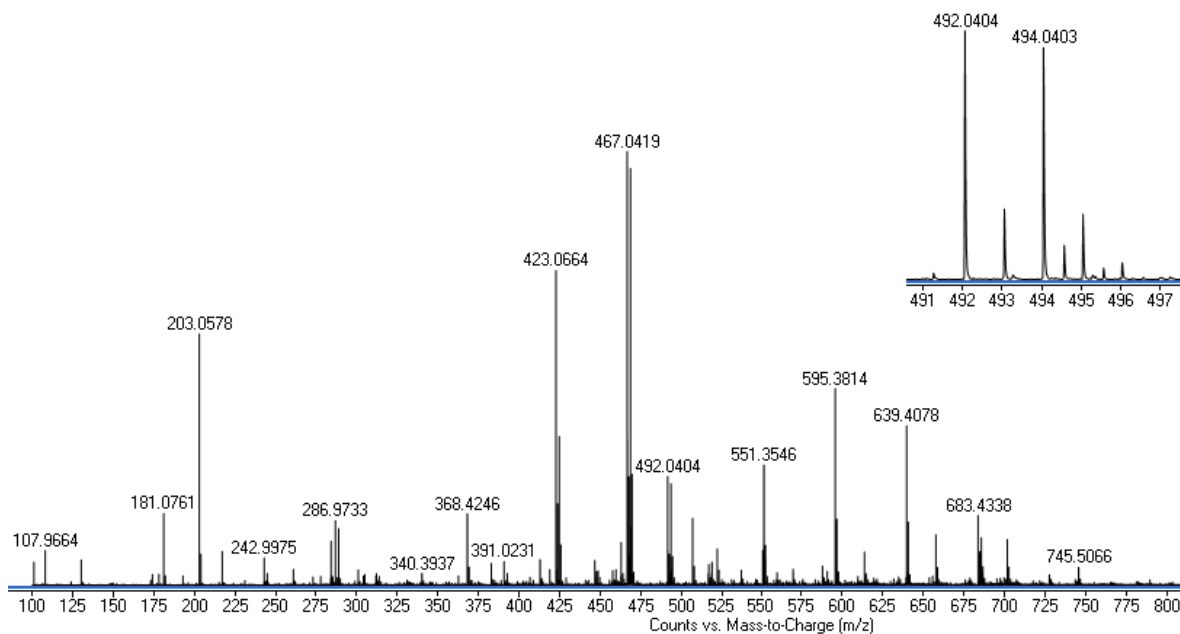


FIGURA A15. Espectro de massas para o complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$.

7.3 Interação dos complexos com o ct-DNA

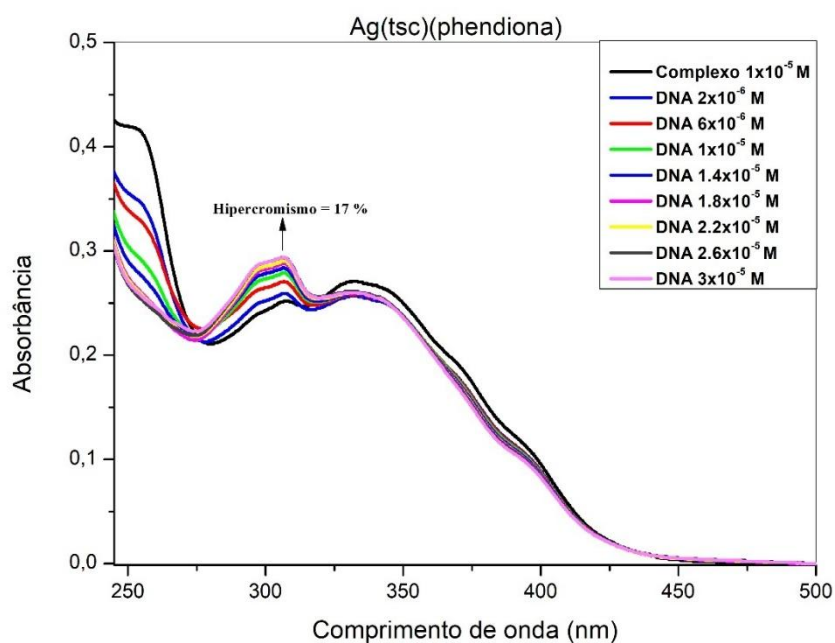


FIGURA A16. Interação do complexo $[\text{Ag}(\text{phendiona})(\text{tsc})]^+$ com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível.

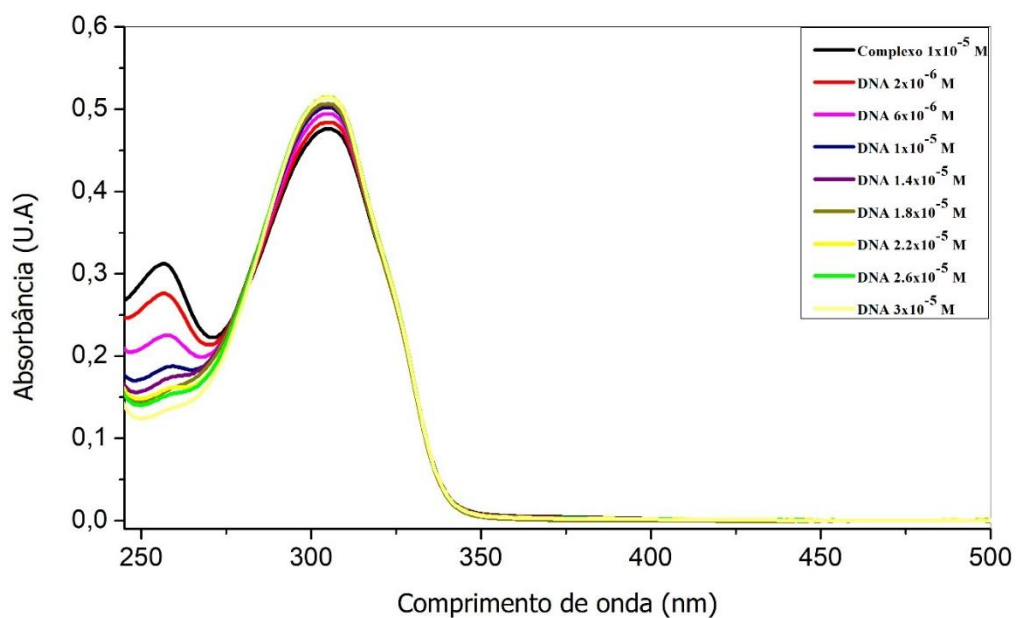


FIGURA A17. Interação do complexo $[Ag(phendiona)(scz)]^+$ com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível.

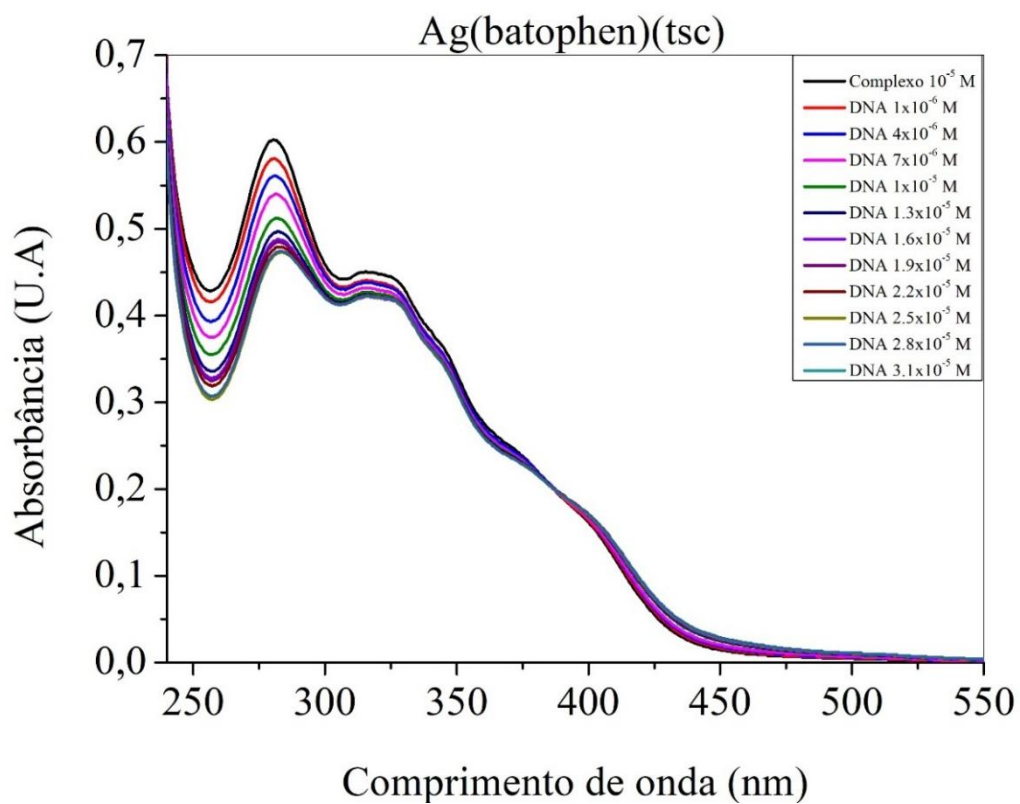


FIGURA A18. Interação do complexo $[Ag(batophen)(tsc)]^+$ com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível.

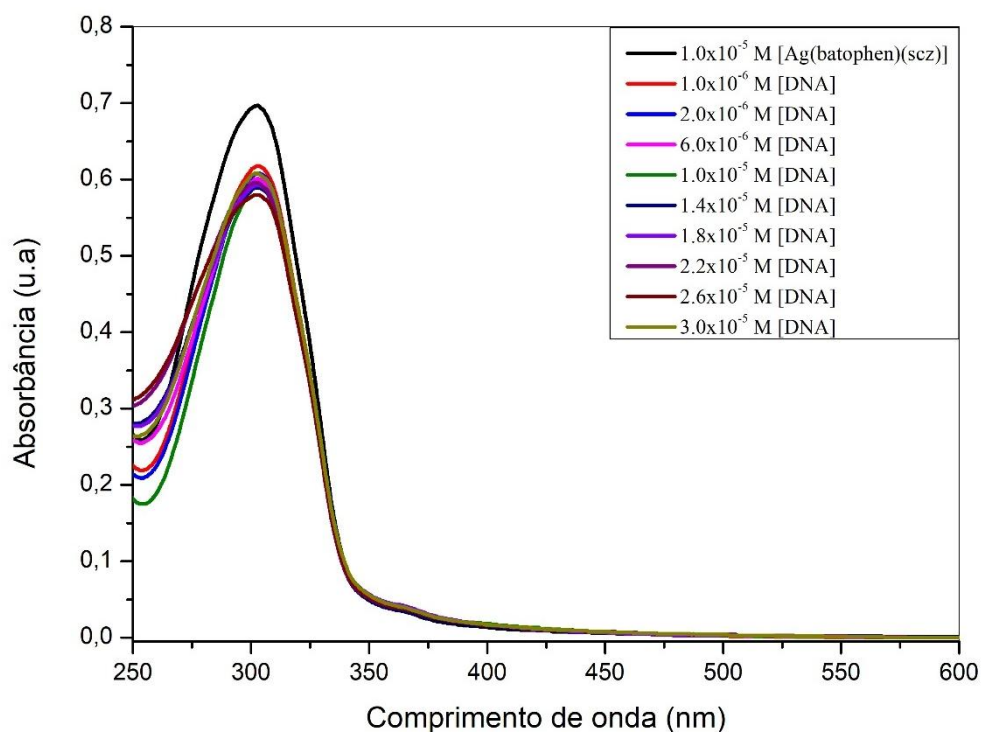


FIGURA A19. Interação do complexo $[Ag(batophen)(scz)]^+$ com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível.

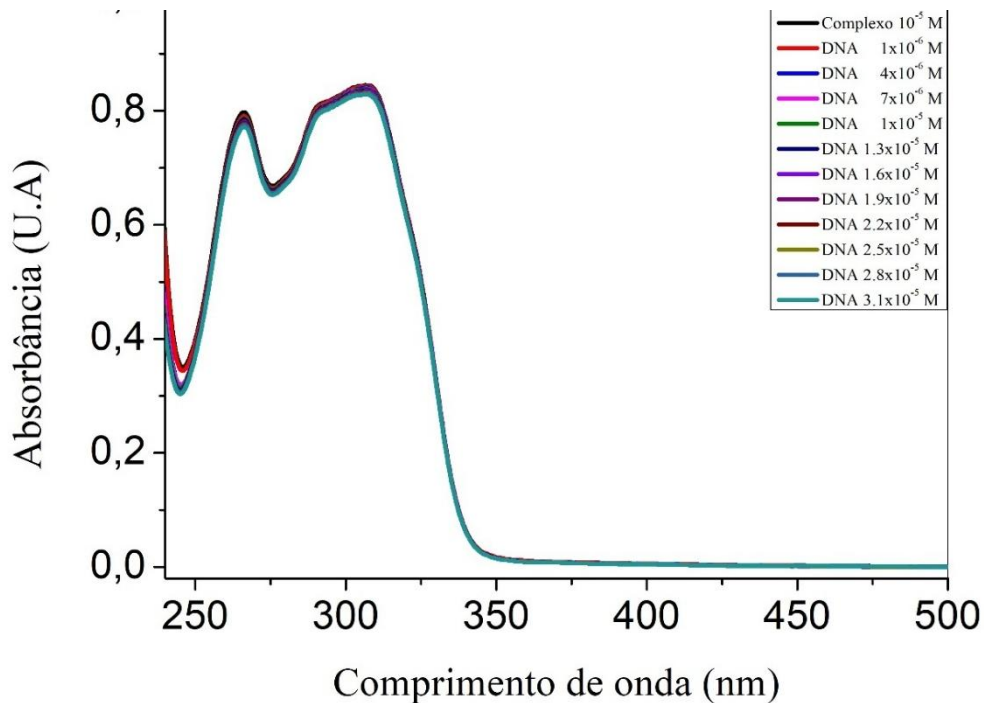


FIGURA A20. Interação do complexo $[Ag(phen)(scz)]^+$ com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível.

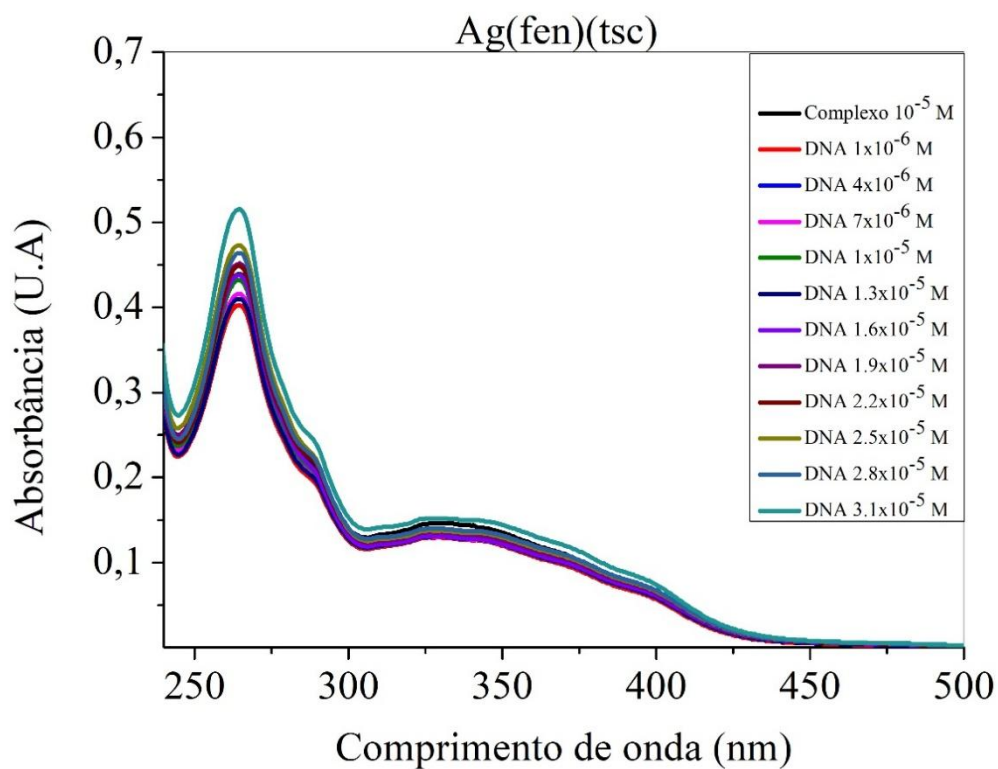
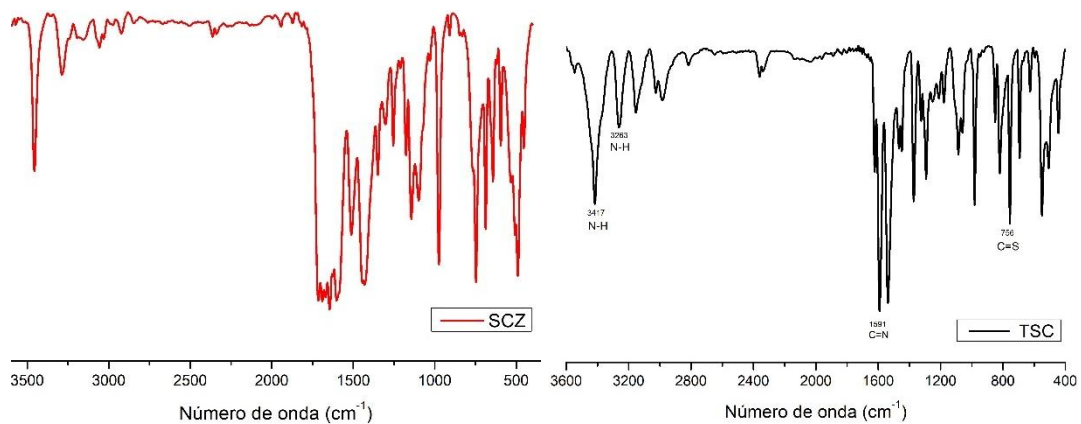


Figura A21. Interação do complexo $[\text{Ag}(\text{phen})(\text{tsc})]^+$ com o ct-DNA por titulação espectroscópica pela técnica de Ultravioleta-visível.

7.4 INFRAVERMELHO



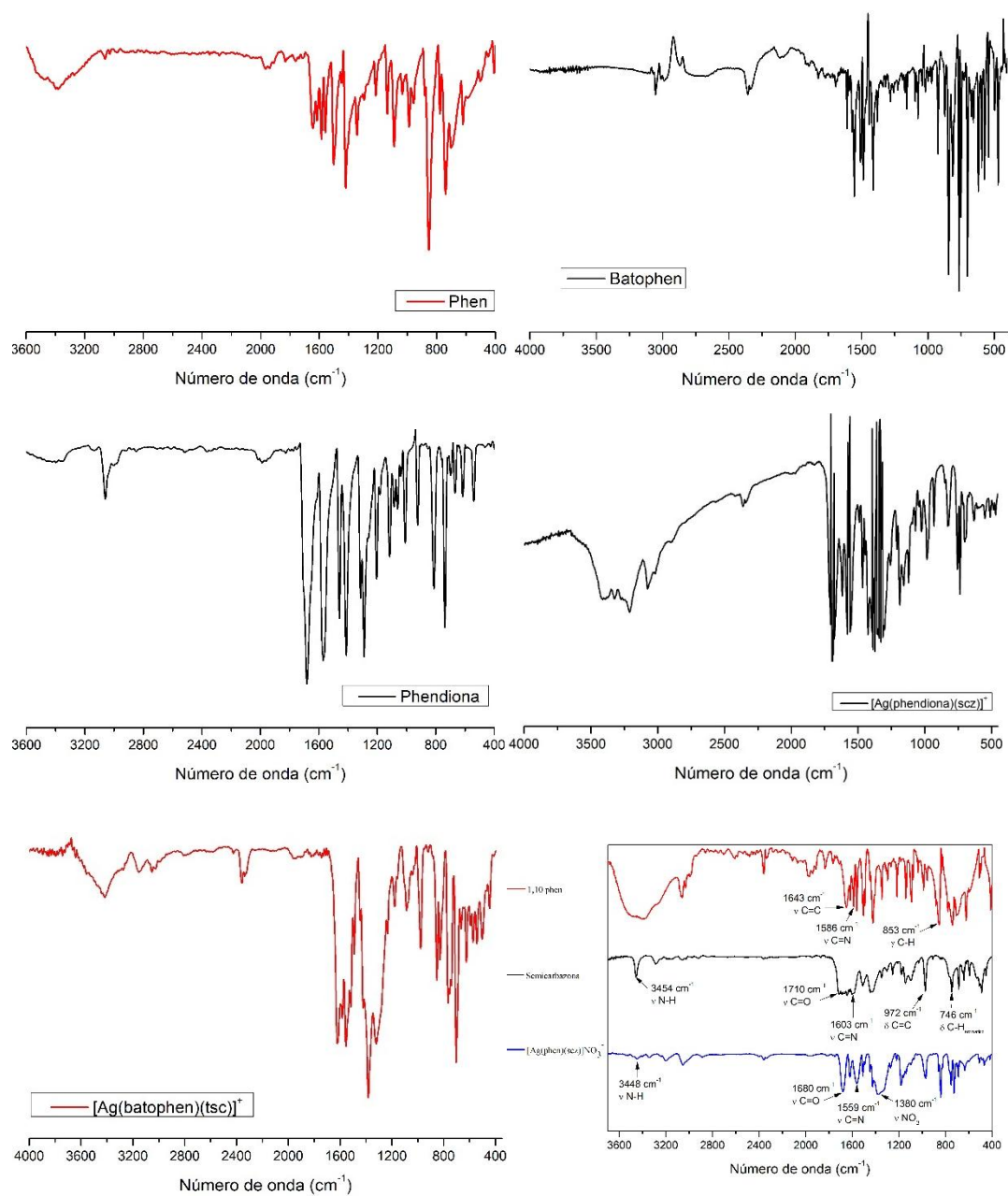


FIGURA A22. Espectros de IV para os ligantes e complexos em KBr.